

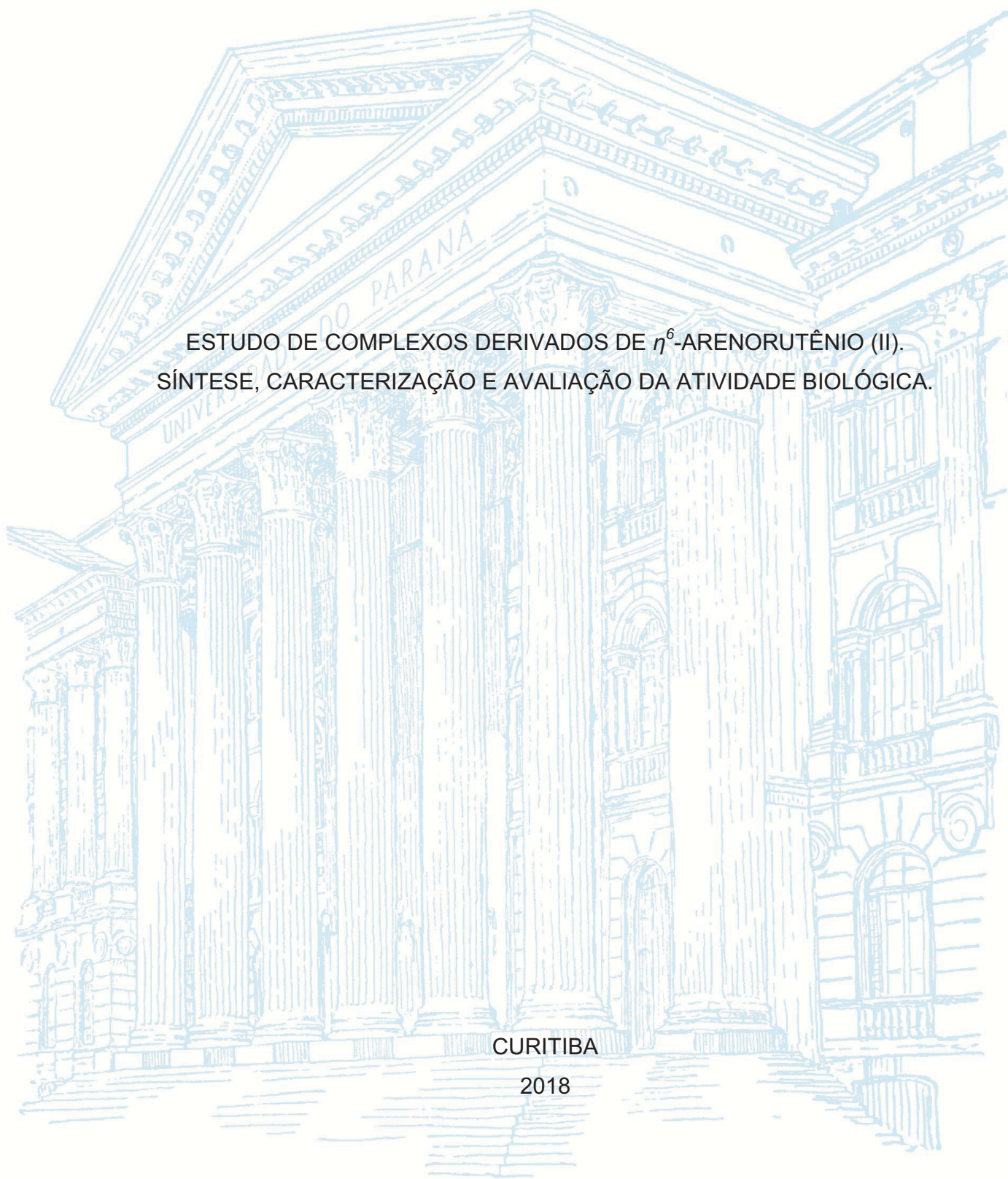
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAQUELINE PAZINATO

ESTUDO DE COMPLEXOS DERIVADOS DE η^6 -ARENORUTÊNIO (II).
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.

CURITIBA

2018



JAQUELINE PAZINATO

ESTUDO DE COMPLEXOS DERIVADOS DE η^6 -ARENORUTÊNIO(II).
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Herbert Winnischofer

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Sheila Maria Brochado Winnischofer

Colaborador: Dr. Attilio Di Pietro (IBCP-França)

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UI PR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

P348c Pazinato, Jaqueline
Estado de complexos derivados de η^6 -arenorutênio(II): síntese,
caracterização e avaliação da atividade biológica / Jaqueline Pazinato
Curitiba, 2018.

Tese - Universidade Federal do Paraná. Setor de Exatas, Programa de Pós-
graduação em Química, 2018.

Orientador: Herbert Winnischofer
Coorientadora: Sheila Maria Brochado Winnischofer
Colaborador: Atilio Di Pietro (IBCP-França)

1. Compostos Químicos. 2. Ligantes (bioquímica). 3. Agentes antitumorais.
4. Glioblastoma. I. Universidade Federal do Paraná. II. Winnischofer, Herbert.
III. Winnischofer, Sheila Maria Brochado. IV. Pietro, Atilio Di. V. Título.

CDD 661.632

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB 9/1585


TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE η^6 -ARENORUTÊNIO(II):
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

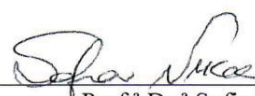
por

JAQUELINE PAZINATO


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



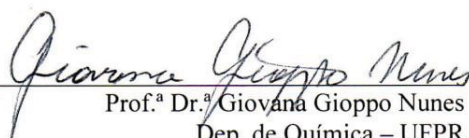
Prof. Dr. Herbert Winnischofer
Orientador
Dep. de Química – UFPR



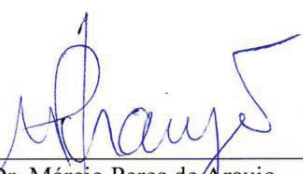
Prof.ª Dr.ª Sofia Nikolaou
Dep. de Química – FFCLRP/USP



Prof.ª Dr.ª Maria Eliane Merlin Rocha
Dep. de Bioquímica – UFPR



Prof.ª Dr.ª Giovana Gioppo Nunes
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Márcio Peres de Araujo
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 19 de janeiro de 2018.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por este momento de conquista.

À minha querida e amada mãe Lúcia pelas suas palavras de incentivo e transmissão de calma nos momentos de angústia. Ao meu amado pai José pelo imenso apoio e incentivo para que eu não desistisse. Obrigada por toda minha vida e pelo amor incondicional.

À minha irmã Vanessa pelo imenso apoio, compreensão e todo o amor. Ao meu cunhado Rodrigo por todos os momentos de descontração e apoio. À minha amada sobrinha Isadora por todo o amor e momentos de alegrias.

À minha irmã Janaína por todo amor, apoio, compreensão e incentivo.

Ao meu orientador Dr. Herbert Winnischofer pela orientação, oportunidade, paciência e confiança, assim como todo o apoio e conselhos. Fatores estes que foram de fundamental importância para a realização desta tese e desenvolvimento profissional e pessoal.

A minha co-orientadora Dr^a. Sheila M. B. Winnischofer, pela orientação, dedicação, atenção e apoio durante toda a tese.

Ao meu orientador do estágio de doutoramento Dr. Attilio Di Pietro, pela orientação e confiança (*Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi*).

Aos membros da banca, professores Sofia Nikolaou, Maria Eliane M. Rocha, Giovana G. Nunes, Marcio P. de Araujo pela avaliação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hugo A. Gallardo Olmedo e ao Prof Dr. Eduard Westphal por fornecer os ligantes utilizados neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Nanomateriais Inorgânicos, Elizangela, Isis, Marcos por toda ajuda nos experimentos, discussões, momentos de descontração e pela amizade.

E aos ex-alunos do grupo que também contribuíram com este trabalho, Denize, Karine e Camila. A doutoranda Elizangela por toda ajuda na espectroscopia de RMN de ^1H .

Aos amigos do DQ e da vida, Danielle, Juliana, Patrícia, Francielle, Roger, Cristiano e Douglas.

Aos amigos do Grupo de Oxidações Biológicas Rafaela, Juliana, Juan e Amanda, que me ajudaram muito nos ensaios biológicos. Ao Dr. Otávio pela ajuda na microscopia óptica e com o cultivo das células.

Aos meus amigos e colegas da equipe Di Pietro no IBCP-França, Hélène Baubichon-Cortay, Vincent Chaptal, Pierre Falson, Sandrine Magnard, Lauriane Dury e Rashad Nars. E especialmente a grande amiga Maya e os amigos brasileiros que a França me deu Nathalia, Caroline e Gustavo.

Às minhas amigas/irmãs Pricila e Aline pelo imenso apoio e amizade. Pois verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo com longas distâncias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFPR pelo apoio institucional.

A Capes pela bolsa de doutorado e ao CNPq pela bolsa de PDSE (estágio de doutoramento).

A todos que participaram desta jornada e contribuíram para meu crescimento profissional e principalmente pessoal.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

Os complexos organometálicos de η^6 -arenorutênio(II) oferecem propriedades químicas que podem ser moduladas para melhorar sua aplicação como potenciais agentes antitumorais. Uma série de compostos anfifílicos de η^6 -arenerutênio(II) contendo ligantes fenilazo (grupo I: compostos 1a, 1b, 2a e 2b) e ligantes feniloxadiazol (grupo II: compostos 3a, 3b, 4a e 4b) foram sintetizados, caracterizados e seu potencial efeito citotóxico foi avaliado em células de glioblastoma humano (linhagens U251, U87MG e T98G). O forte caráter π -aceitador dos ligantes azo/oxadiazol e a retroligação π ao centro metálico de Ru(II) levam a reação de substituição e saída do ligante benzeno, numa cinética de primeira ordem, mas essa reação não influencia na citotoxicidade dos compostos e nem a explica. Os complexos η^6 -arenorutênio(II) do derivado azo (grupo I) exibiram citotoxicidade mais elevada em todas as linhagens celulares avaliadas, enquanto a maioria dos complexos derivados de oxadiazol (grupo II) foram pouco citotóxicos, exceto o composto 4a. Os complexos catiônicos 2a, 2b e 4a foram os mais citotóxicos. Todos os compostos que apresentaram elevada citotoxicidade foram capazes de promover alteração na progressão do ciclo celular de células T98G (com redução significativa na porcentagem de células na fase G0 / G1 e aumento da porcentagem de células na fase G2 / M), concomitante ao aumento da porcentagem de células com DNA fragmentado, sugerindo indução de morte celular por apoptose. Os compostos de η^6 -arenorutênio(II) também foram avaliados quanto a sua capacidade de serem efluxados das células por transportadores ABC, especificamente P-gp, MRP1 e ABCG2. Os compostos 2b e 4a foram substratos para a proteína P-gp, com índice de resistência de 8,6 e 1,9, respectivamente. O composto 2b também foi um substrato para proteínas ABCG2 e MRP1, com menor índice de resistência (1,8 e 1,6, respectivamente). Ainda, foi verificado que o composto 2b interage com glutathione, o que poderia explicar seu efluxo por MRP1 e seu efeito citotóxico, uma vez que essa interação diminui a concentração intracelular de glutathione, podendo melhorar o resultado clínico. O composto 1b apresentou menor valor de $IG_{50} = 31.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para a linhagem celular T98G, que apresentou ser a mais resistente das linhagens aos compostos estudados. Nossos resultados mostram que os complexos anfifílicos de η^6 -arenorutênio(II) são compostos com ação citotóxica para glioblastomas, destacando os compostos 2b e 1b; o primeiro foi citotóxico para as três linhagens celulares testadas, embora seja transportado pelos três principais transportadores ABC, enquanto o segundo apresentou ser mais citotóxico para a linhagem T98G em comparação com seu efeito nas linhagens U87MG e U251.

Palavras-chave: η^6 -arenorutênio(II), estabilidade, solvólise, agentes antitumorais, glioblastoma, transportadores ABC.

ABSTRACT

The organometallic η^6 -areneruthenium(II) complexes provide chemical properties that can be modulated to improve their application as potential antitumor agents. A series of amphiphilic η^6 -areneruthenium(II) compounds containing phenylazo ligands (group I: compounds 1a, 1b, 2a and 2b) and phenyloxadiazole ligands (group II: compounds 3a, 3b, 4a and 4b) were synthesized, characterized and the cytotoxicity evaluated in human glioblastoma cell lines (U251, U87MG and T98G). The strong π -acceptor character of the azo / oxadiazole ligands and the π -back-bonding with Ru(II) center lead to a substitution reaction of the benzene ligand in a first order kinetics. This substitution reaction does not influence the biological activity of the compounds and does not explain their cytotoxicity. The azo derivative η^6 -areneruthenium(II) complexes (group I) exhibited higher cytotoxicity on all cell lines evaluated, whereas the majority of oxadiazole-derived complexes (group II) are less-cytotoxic, except compound 4a. The cationic complexes 2a, 2b and 4a were the most cytotoxic. All cytotoxic compounds were able to promote alterations in the cell cycle progression of the T98G cells (with reduction in the percentage of cells into G0 / G1 phase and increase in the percentage of cells into G2 / M phase), with concomitant increase in the percentage of cells exhibiting DNA fragmentation, suggesting induction of cell death by apoptosis. The η^6 -areneruthenium(II) compounds were also investigated for their ability to be effluxed by ABC transporters, specifically P-gp, MRP1 and ABCG2. Compounds 2b and 4a were substrates for the P-gp protein, with resistance indexes of 8.6 and 1.9, respectively. Compound 2b was also a substrate for ABCG2 and MRP1 proteins, with lower resistance indexes (1.8 and 1.6, respectively). Furthermore, it was verified that compound 2b interacts with glutathione, which could explain its efflux by MRP1 and its cytotoxic effect, since this interaction decreases the intracellular amount of glutathione and may improve clinical results. Compound 1b presented the lowest $IG_{50} = 31.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for the T98G cell line which is the most resistant glioblastoma cell line studied. Our results show that the amphiphilic complexes of η^6 -areneruthenium(II) are promising cytotoxic compounds for glioblastomas, especially compounds 2b and 1b; The compound 2b was cytotoxic to three cell lines tested, although it was transported by three main ABC transporters, whilst the compound 1b was the most cytotoxic to the T98G cell line in comparison to its effect in the U87MG and U251 cell lines.

Keywords: η^6 -areneruthenium(II), stability, solvolysis, antitumor agents, glioblastoma, ABC transporters.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DMSO – dimetilsulfóxido

EPH – eletrodo padrão de hidrogênio

ESI-MS – “Electrospray ionization mass spectrometry” – Espectrometria de Massa por ionização eletrospray

$E_{1/2}$ – potencial de meia onda, calculado através da relação $(E_{pa} + E_{pc})/2$

E_{pa} – potencial de pico anódico

E_{pc} – potencial de pico catódico

FTIR – “Fourier transform infrared spectroscopy” – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

MLCT – transferência de carga do metal para o ligante

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

UV – ultravioleta

UV-vis – ultravioleta-visível

δ - deslocamento químico (RMN) ou deformação do ângulo no plano (FTIR e Raman)

ν - estiramento (FTIR e Raman)

π - deformação do ângulo fora do plano (FTIR e Raman) ou simetria do orbital envolvido numa transição eletrônica

ϵ - coeficiente de absorvidade molar

$\lambda_{\text{máx}}$ – comprimento de onda de absorção máxima

PBS - “*phosphate buffered saline*” – tampão fosfato salino

GBM – Glioblastoma multiforme

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathione dissulfeto

MDR – “*Multidrug resistance*” – Resistência a múltiplas drogas

ATP – Adenosina fosfato

ADP- Adenosina difosfato

ABC – “*ATP-binding cassette*” – proteínas transportadoras da superfamília ABC

DNA- Ácido desoxirribonucleico

P-gp- glicoproteína-P

ABCG2- Proteína resistente ao câncer de mama

MRP1- Proteína associada à MDR

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estruturas químicas de medicamentos anticancerígenos de platina clinicamente aprovados e comercializados. Adaptado de Lazarevic <i>et al.</i> ¹¹	23
Figura 1.2. Complexos de rutênio (III) em ensaios clínicos para tratamento de câncer. KP1019 ([IndH][<i>trans</i> -RuCl ₄ (ind) ₂]; ind = indazol) e NAMI-A ([ImH][<i>trans</i> -RuCl ₄ (Im)(DMSO)]); im = imidazol). Adaptado de Suss-Fink. ⁷	24
Figura 1.3. Reação atualmente empregada para a formação do [$\{(\eta^6\text{-areno})\text{ClRu}\}_2\text{Cl}_2$]. Adaptado de Therrien. ³¹	27
Figura 1.4. Reação para a formação de complexos de η^6 -arenorutênio(II) envolvendo a troca dos ligantes arenos. Adaptado de Therrien. ³¹	27
Figura 1.5. Inserção de funcionalidade de complexos de areno-rutênio. Adaptado de Smith <i>et al.</i> ⁴⁴	28
Figura 1.6. Exemplos de complexos organometálicos (η^6 -areno) como agentes antitumorais. Adaptado de Han Ang <i>et al.</i> ⁹	30
Figura 1.7. Hidrólise da ligação Ru-Cl nos complexos η^6 -arenorutênio, mostrando a dependência do ligante quelante. Os complexos contendo N,N-ligantes são mais ácidos e hidrolisam mais lentamente. Adaptado de Noffke <i>et al.</i> ⁵⁰	31
Figura 1.8. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma..	33
Figura 1.9. Glioblastoma em diferentes regiões do cérebro, caracterizadas por vários graus de integridade da barreira hemato-encefálica. Adaptado de van Tellingen <i>et al.</i> ⁵⁹	37
Figura 1.10. Modelos de estrutura secundária de transportadores de substratos de drogas da família de cassete de ligação de ATP.	40
Figura 1.11. Função dos transportadores ABC	41
Figura 1.12. Representação esquemática do ciclo catalítico da glutathione.	44
Figura 3.1. Esquema ilustrativo para a síntese do complexo precursor [$\{(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}\}_2\text{Cl}_2$].	53
Figura 3.2. Esquema ilustrativo para a síntese dos compostos neutros 1a, 1b, 3a e 3b.	54

Figura 3.3. Esquema ilustrativo para a síntese dos compostos catiônicos 2a, 2b, 4a e 4b.	56
Figura 3.4. Redução de MTT em Formazan em células vivas pela ação de redutases celulares. ¹¹⁸	63
Figura 3.5. Parâmetros medidos pela citometria de fluxo.	64
Figura 4.1. Espectro de RMN de ¹ H do composto 1a em CDCl ₃	71
Figura 4.2. Espectro de RMN de ¹ H do composto 1b em CDCl ₃	72
Figura 4.3. Espectro de RMN de ¹ H do composto 2a em CDCl ₃	73
Figura 4.4. Espectro de RMN de ¹ H do composto 2b em (CD ₃) ₂ SO.	74
Figura 4.5. Espectro de RMN de ¹ H do composto 3a em CDCl ₃	75
Figura 4.6. Espectro de RMN de ¹ H do composto 3b em CDCl ₃	76
Figura 4.7. Espectro de RMN de ¹ H do composto 4a em CDCl ₃	77
Figura 4.8. Espectro de RMN de ¹ H do composto 4b em CDCl ₃	78
Figura 4.9. Espectro de ESI-MS do composto 2a. Observa-se opico mais intenso referente ao íon molecular, à espécie [RuON ₃ ClC ₂₉ H ₃₉] ⁺ ([2a-PF ₆] ⁺) e o pico em m/z 548.41 referente a espécie [RuON ₃ C ₂₉ H ₃₉] ²⁺	80
Figura 4.10. Espectro de ESI-MS do composto 2b. Observa-se o pico mais intenso referente ao íon molecular, à espécie [RuON ₃ ClC ₁₈ H ₁₇] ⁺ ([2b-PF ₆] ⁺).	81
Figura 4.11. Espectro de ESI-MS do composto 4a. Observa-se o pico mais intenso referente ao íon molecular, à espécie [RuO ₂ N ₃ ClC ₃₁ H ₃₉] ⁺ ([4a-PF ₆] ⁺).	82
Figura 4.12. Espectro de ESI-MS do composto 4b. Observa-se o pico mais intenso referente ao íon molecular, à espécie [RuO ₂ N ₃ ClC ₂₀ H ₁₇] ⁺ ([4b-PF ₆] ⁺) e o pico em m/z 432.17 referente a espécie [RuO ₂ N ₃ C ₂₀ H ₁₇] ²⁺	83
Figura 4.13. Espectro ESI-MS do composto 1a. O pico de maior intensidade referente ao ligante (L1a) 4-(4'-dodeciloxifenilazo)piridina. Adição de ácido acético para protonar a espécie e formar cátion.	84
Figura 4.14. Espectro ESI-MS do composto 1a. Expansão do conjunto de picos isotópicos centrados m/z em 606.22. Na inserção o gráfico simulado considerando apenas a distribuição isotópica do rutênio na molécula esperada [(η ⁶ -C ₆ H ₆)(L1a)Ru(CH ₃ COO)] ⁺	85

Figura 4.15. Espectro ESI-MS do composto 1b. O pico de maior intensidade referente ao ligante (L1b), 4-(4'-metoxifenilazo)piridina. Adição de ácido acético para protonar a espécie e formar cátion.	86
Figura 4.16. Espectro ESI-MS do composto 3a. O pico de maior intensidade do ligante (L3a) 4-{(4-dodeciloifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina. Adição de ácido acético para protonar a espécie e formar cátion.....	87
Figura 4.17. Espectro ESI-MS do composto 3b. O pico do ligante (L3b) 4-{(4-metoxifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina. Adição de ácido acético para protonar a espécie e formar cátion.	88
Figura 4.18. Espectros de infravermelho do grupo I: 1a, 1b, 2a e 2b.....	89
Figura 4.19. Espectros de infravermelho do grupo II: 3a, 3b, 4a e 4b.....	90
Figura 4.20. Espectro eletrônico do complexo precursor $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}]_2\text{Cl}_2$ em DMSO.	92
Figura 4.21. Espectros eletrônicos dos ligantes (A) 4-(4'-dodeciloifenilazo)piridina (L1a), 4-(4'-metoxifenilazo)piridina (L1b), 2-(4'-dodeciloifenilazo)piridina (L2a) e 2-(4'-metoxifenilazo)piridina (L2b); (B) 4-{(4-dodeciloifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina (L3a), 4-{(4'-metoxifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina (L3b), 2-{(4-dodeciloifenil)-1,3,4-oxidiazol-2-il}piridina (L4a) e 2-{(4'-metoxifenil)-1,3,4-oxidiazol-2-il}piridina (L4b) em clorofórmio...	92
Figura 4.22. Espectros eletrônicos dos complexos de η^6 -areneorutênio (II) com (linha preta) dodeciloxi e (linha vermelha) metoxi fenil azo- (A) 1a e 1b, (B) 2a e 2b; e oxidiazol- compostos (C) 3a e 3b; (D) 4a e 4b em clorofórmio.	94
Figura 4.23. Caracterização eletroquímica dos ligantes L1a, L1b, L2a e L2b.....	95
Figura 4.24. Caracterização eletroquímica dos compostos 1a e 1b.....	97
Figura 4.25. Caracterização eletroquímica dos compostos 2a e 2b.....	98
Figura 4.26. Espectroeletroquímica UV-Vis do composto 2a, obtidos a partir de soluções $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em CH_3CN , aplicando os potenciais de -0.08V (linha preta) e -0.43V (linha vermelha) durante 15 minutos cada. Na inserção o voltamograma cíclico do composto 2a.....	100
Figura 5.1. Espectros UV-Vis dos compostos (A) 2b e (B) 4b ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) dependentes do tempo em 1% DMSO e PBS à temperatura ambiente.	105
Figura 5.2. Espectros UV-Vis dos compostos (A) 2b e (B) 4b ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) dependentes do tempo em DMSO à temperatura ambiente.....	106

Figura 5.3. Espectros UV-Vis dos compostos (A) 2b e (B) 4b ($15\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dependentes do tempo em H_2O contendo 1% de DMSO e $0,017\text{ mmol}$ de AgNO_3 à temperatura ambiente.	107
Figura 5.4. Espectros UV-vis do composto 2b em 1% DMSO e H_2O , em solução de NaCl (A) $4\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e (B) $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, por 72h.	107
Figura 5.5. Espectro de RMN de ^1H do composto 2a em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ durante 72h. Atribuições dos picos: (*) benzeno livre, (•) picos da nova espécie formada, composto 2a após a solvólise.	109
Figura 5.6. Espectro de RMN de ^1H do composto 2b em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ durante 72h. Atribuições dos picos: (*) benzeno livre, (•) picos da nova espécie formada, composto 2b após a solvólise.	110
Figura 5.7. Espectro de RMN de ^1H do composto 4a em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ durante 72h. Atribuições dos picos: (*) benzeno livre, (•) picos da nova espécie formada, composto 4a após a solvólise.	111
Figura 5.8. Espectro de RMN de ^1H do composto 4b em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ durante 72h. Atribuições dos picos: (*) benzeno livre, (•) picos da nova espécie formada, composto 4b após a solvólise.	112
Figura 5.9. Proposta de reação para a solvatação de compostos de η^6 -arenorutênio. Adaptado de Karlen <i>et al.</i> ¹³⁷	113
Figura 5.10. Espectro UV-vis em DMSO após 72h de reação, alíquotas da solução utilizada nos espectros de RMN de ^1H	114
Figura 5.11. Curva cinética resultante da diminuição da absorbância em função do tempo (segundos), ajustadas pela equação $A = (A_0 - A_\infty)e^{-kt} + A_\infty$. Compostos (A) 2a , (B) 2b , (C) 4a e (D) 4b	116
Figura 6.1. Efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) em células T98G.	121
Figura 6.2. Efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) em células U87MG.	122
Figura 6.3. Efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) em células U251..	123
Figura 6.4. Microscopia ótica das células U87MG sob o efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo I: 1a , 1b , 2a e 2b	129
Figura 6.5. Microscopia ótica das células U87MG sob o efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo II: 3a , 3b , 4a e 4b	130

Figura 6.6. Microscopia ótica das células U251 sob o efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo I: 1a, 1b, 2a e 2b..	131
Figura 6.7. Microscopia ótica das células U251 sob o efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo II: 3a, 3b, 4a e 4b..	132
Figura 6.8. Fases do ciclo celular e checkpoints. Adaptado de Garret <i>et al.</i> ¹⁴²	135
Figura 6.9. Efeito de compostos de η^6 -arenorutênio(II) sobre a progressão do ciclo celular em células de glioblastoma T98G (as condições experimentais são descritas no Capítulo 3 no item 3.9)..	137
Figura 6.10. Porcentagem de células hipodiplóides, DNA fragmentado, em células T98G.	137
Figura 7.1. Efeito citotóxico do composto 2b em células que superexpressam proteínas ABC transportadoras.....	145
Figura 7.2. Efeito citotóxico do composto 4a em células que superexpressam proteínas ABC transportadoras.....	146
Figura 7.3. Espectros UV-vis da interação do composto 2b com GSH.	149
Figura 7.4. Ciclo proposto para a oxidação catalítica de GSH a GSSG pelo composto 2b..	150
Figura 7.5. Efeitos citotóxicos do composto 2b em células de glioblastoma T98G.....	151
Figura 7.6. Efeito dos compostos de η^6 -arenorutênio (II) sobre o transporte mediado por (A) Pgp, (B) ABCG2 e (C) MRP1. (As condições experimentais são descritas no Capítulo 3 no item 3.8).	153

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1. Estruturas dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) anfílicos contendo ligantes fenilazo (grupo I) e feniloxadiazol (grupo II) estudados e suas respectivas massas molares	58
Tabela 4.1. Dados obtidos por RMN de ^1H para os compostos η^6 -arenorutênio (II) e ligantes livres em CDCl_3 e $^*(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	70
Tabela 4.2. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre L1a e.....	71
Tabela 4.3. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre L1b e.....	72
Tabela 4.4. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre L2a e.....	73
Tabela 4.5. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre L2b e.....	74
Tabela 4.6. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre L3a e.....	75
Tabela 4.7. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre L3b e.....	76
Tabela 4.8. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre L4a e.....	77
Tabela 4.9. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre L4b e.....	78
Tabela 4.10. Valores das bandas dos espectros de FTIR e suas respectivas atribuições.....	91
Tabela 4.11. Potenciais de pico catódicos e potenciais de meia onda obtidos dos voltamogramas cíclicos dos compostos η^6 -arenerutênio (II) do grupo I e dos ligantes derivados de azopiridina.	99
Tabela 5.1. Constante cinética de primeira ordem da saída do ligante benzeno dos compostos catiônicos de η^6 -arenorutênio(II).	115
Tabela 6.1. Porcentagem de células metabolicamente ativas T98G em relação ao controle pelo método de MTT	124
Tabela 6.2. Porcentagem de células metabolicamente ativas U87MG em relação ao controle pelo método MTT	124
Tabela 6.3. Porcentagem de células metabolicamente ativas U251 em relação ao controle pelo método MTT	125
Tabela 6.4. Citotoxicidade dos compostos de arenorutênio(II) em linhagens celulares de glioblastoma humano U251, U87MG e T98G.	127

Tabela 7.1. Citotoxicidade dos compostos de arenorutênio (II) frente as linhagens celulares NIH3T3, HEK293 e BHK21..... 142

Tabela 7.2. Índice de resistência dos compostos 2b e 4a para as proteínas transportadoras Pgp, ABCG2 e MRP1..... 143

SUMÁRIO

Capítulo 1 . Introdução	22
1.1. Química inorgânica medicinal.....	22
1.2. Complexos de η^6 -arenorutênio(II).....	26
1.2.1. Complexos de η^6 -arenorutênio(II) como agentes antitumorais	29
1.3. Glioblastomas (GBM)	33
1.3.1. Diagnóstico e tratamento para glioblastomas	35
1.3.2. Mecanismo de resistência a drogas	36
1.3.3. Proteínas transportadoras da superfamília ABC	38
1.4. Expressão de transportadores ABC em gliomas	42
1.4.1. Relação entre o transportador MRP1 e GSH	43
1.5. Justificativa do projeto de estudo.....	46
Capítulo 2 - Objetivos.....	49
2.1. Objetivos gerais	49
2.2. Objetivos específicos	49
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	52
3.1. Reagentes e Solventes	52
3.2. Sínteses	52
3.2.1. Síntese dos compostos 1a, 1b, 3a e 3b (complexos neutros)	53
3.2.2. Síntese dos compostos 2a, 2b, 4a, 4b (complexos catiônicos)	55
3.3. Técnicas de caracterização.....	59
3.6. Ensaio em Modelos Biológicos.....	61
3.6.1. Linhagem celular	61
3.6.2. Condições de cultivo das linhagens celulares	62
3.7. Ensaio de citotoxicidade celular : MTT.....	62
3.8. Ensaio de inibição das proteínas transportadoras da família ABC por Citometria de fluxo	63
3.9. Análise de ciclo celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo	65
Capítulo 4 . Síntese e caracterização dos compostos η^6 -arenorutênio(II).....	68
4.1. Sínteses dos compostos η^6 -arenorutênio(II).....	68
4.2. Ressonância magnética nuclear de ^1H	69
4.3. Espectrometria de massa (ESI-MS)	79
4.4. Espectroscopia no infravermelho.....	88

4.5. Espectroscopia eletrônica UV-visível	91
4.6. Voltametria cíclica e espectroeletroquímica UV-visível	95
4.6.1. Voltametria cíclica	95
4.6.2. Espectroeletroquímica UV-visível	99
Capítulo 5 – Substituição de ligantes nos compostos de η^6 -arenorutênio(II)	103
5.1. Estudo da estabilidade	103
5.2. Estudo da substituição de ligantes	108
5.3. Estudo cinético	114
Capítulo 6 – Atividade biológica dos compostos de η^6 -arenorutênio(II)	119
6.1. Citotoxicidade celular	119
6.2. Análise do ciclo celular e DNA fragmentado nas células T98G	134
6.3. Conclusões parciais	138
Capítulo 7 – Proteínas transportadoras de múltiplas drogas da família ABC	140
7.1. Capacidade de efluxo por proteínas transportadoras de múltiplas drogas da família ABC	140
7.2. Capacidade de inibição das proteínas transportadoras de múltiplas drogas da família ABC pelos compostos de η^6 -arenorutênio(II)	152
Capítulo 8 – Conclusões	156
8.1. Conclusões	156
Capítulo 9 – Referências Bibliográficas	160

Capítulo 1:

Introdução

Capítulo 1 . Introdução

1.1. Química inorgânica medicinal

O estudo das propriedades medicinais de compostos inorgânicos foi impulsionada pela descoberta histórica da atividade antitumoral do *cis*-diamindicloroplatina(II), denominado cisplatina (Figura 1.1), por Rosenberg em 1965, que desencadeou uma nova era na pesquisa antitumoral com base em metalofármacos.¹ O fármaco cisplatina e seus análogos, como a carboplatina e o oxaliplatina (Figura 1.1), são alguns quimioterápicos eficazes em uso clínico. No final da década de 1970 e início da década de 1980, Köpf e Köpf-Maier²⁻⁴ investigaram uma ampla gama de compostos metallocenos, em particular o dicloreto de titanoceno [Cp₂TiCl₂] (Cp= ciclopentadieno) que alcançou ensaios clínicos de fase II, mas foram interrompidos por não apresentarem remissão do tumor.^{5,6}

Os fármacos de Pt(II) são ativados por hidrólise e seus correspondentes aquocomplexos catiônicos formados atuam ligando-se preferencialmente aos sítios mais nucleofílicos de DNA, os átomos de N7 da guanina e adenina. O aquocomplexo pode se ligar a uma base nitrogenada, formando um aduto monofuncional, ou a duas bases nitrogenadas levando a formação de ligações cruzadas no DNA.^{7, 8} No entanto, alguns problemas, como a alta toxicidade e a contribuição para fenótipo de resistência a múltiplas drogas, intrínseca ou adquirida, está intimamente relacionado com a falta de seletividade da cisplatina, tornam-se os principais desafios para sua aplicação clínica. Essas limitações têm proporcionado a motivação para estratégias quimioterapêuticas alternativas.^{7, 9, 10, 11}

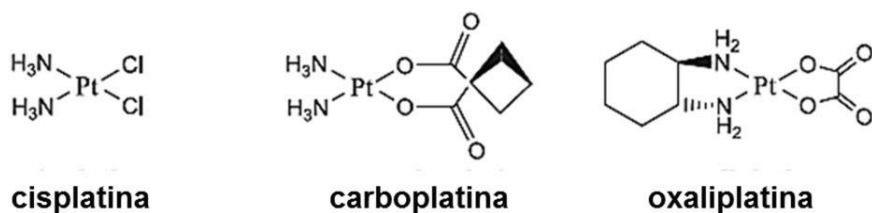


Figura 1.1. Estruturas químicas de medicamentos anticancerígenos de platina clinicamente aprovados e comercializados. Adaptado de Lazarevic *et al.*¹¹

Na busca por agentes antitumorais que contenham metais diferentes da platina, os compostos de rutênio se revelaram os mais promissores.⁹ Os estudos de aplicações medicinais de compostos de rutênio são facilitados devido a sua grande diversidade química de coordenação e organometálica. Entre as principais características químicas relevantes para a atividade biológica dos complexos de rutênio estão os estados de oxidação acessíveis em solução fisiológica, Ru(II) e Ru(III). Nos dois estados de oxidação, o íon de rutênio possui geometria octaédrica e tem boa afinidade por ligantes, presente nas biomoléculas, contendo átomos de nitrogênio e enxofre doadores.^{11, 12}

Os primeiros compostos de rutênio a serem estudados com atividade biológica foram complexos de cloro-amina por Durig *et al.*¹³ em 1976. Os autores observaram que o complexo *cis*-Ru(NH₃)₃Cl₃ causa alterações biológicas como o crescimento filamentosos em *Escherichia coli*, na mesma concentração que a cisplatina causa esse efeito.¹³ Como consequência foram impulsionados estudos explorando esse e outros complexos de rutênio avaliando, principalmente, as atividades antitumorais. Nos anos seguintes, um grande número de compostos de Ru(II) e Ru(III) foram propostos e estudados quanto às suas propriedades citotóxicas, em particular complexos polipiridínicos, tais como *mer*-Ru(N,N,N-terpy)Cl₃ (bipy = 2,2' - bipyridina, terpy = 2,2':6'2'' - terpiridina), complexos aminocarboxilato, como Ru(N,N,O,O-pdta)Cl₂ e [Ru(N,N,O,O,O-edta)Cl]⁻ (pdta = propilenodiaminotetraacetato, edta = etilenodiaminotetraacetato) e complexos de dimetilsulfóxido, como *cis*- e *trans*-Ru(S-DMSO)₄Cl₂.^{7, 9}

Os estudos posteriores produziram os primeiros e únicos complexos de Ru(III) a atingir à fase de testes clínicos, o KP1019 ($[\text{IndH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{ind})_2]$; ind = indazol) e NAMI-A ($[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})(\text{dmso})]$; im = imidazol) (Figura 1.2) (Fase I para o KP1019 e Fases I e II para o NAMI-A).^{9, 14, 15} Em estudos pré-clínicos, o NAMI-A reduziu seletivamente a formação e crescimento de metástases de tumores malignos tais como carcinoma mamário, carcinoma de pulmão de Lewis e adenocarcinoma,¹⁶ mas não apresenta efeito citotóxico em tumores primários. Os mecanismos de ação propostos para o NAMI-A incluem a alteração na progressão do ciclo celular com diminuição da porcentagem de células na fase G2/M e também a inibição da atividade de metaloproteínase, uma endopeptidase dependente de zinco que promove a degradação da matriz extracelular.^{17, 18 19} Após a conclusão da fase II, os testes clínicos do NAMI-A foram descontinuados, pois mostrou-se tóxico nas condições de realização dos testes em humanos.²⁰

Estudos do KP1019 demonstraram que este possui atividade citotóxica em linhagens celulares de colo retal, aparentemente através da indução de apoptose por via intrínseca das mitocôndrias, com liberação do citocromo C e ativação de caspase 3. Também foi demonstrado que o efeito citotóxico do KP1019 é mediado pelo estresse oxidativo, com aumento da concentração de H_2O_2 .^{19, 21-23} Porém, o KP1019 não conseguiu avançar para ensaios clínicos de Fase II devido a baixa solubilidade.²⁴

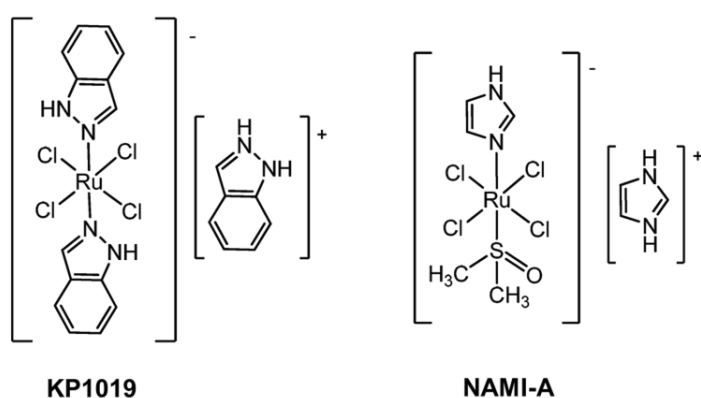


Figura 1.2. Complexos de rutênio (III) em ensaios clínicos para tratamento de câncer. KP1019 ($[\text{IndH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{ind})_2]$; ind = indazol) e NAMI-A ($[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]$; im = imidazol). Adaptado de Suss-Fink.⁷

Um possível mecanismo de ação de complexos de Ru (III) é ativação por redução, onde os complexos de Ru(III) podem servir como pró-fármacos, ou seja, são ativados por redução *in vivo*. Na reação de redução que produz a espécie Ru(II), mais susceptível a reações de substituição, favorece a coordenação desses complexos em biomoléculas.²⁵ Os tecidos tumorais possuem condições que favorecem o estado reduzido de Ru(II). Devido ao crescimento descontrolado das células tumorais, esse crescimento pode não ser acompanhado pela criação de novos vasos sanguíneos. O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é conhecido por neovascularização ou angiogênese tumoral. Esse processo tem a função de dar aporte de oxigênio às células em atividade metabólica. Nos casos em que a neovascularização não acompanha o crescimento descontrolado do tumor, o suprimento de oxigênio torna-se insuficiente no interior da massa, levando a uma situação de hipóxia (baixa concentração de O₂).²⁶ Neste caso, a via glicolítica anaeróbica para obtenção de adenosina trifosfato (ATP) torna-se a via metabólica preferencialmente ativa. Como consequência, ocorre maior captação de glicose levando a alta produção de ácido láctico, através da redução de piruvato. O estado de hipóxia causa essas diferenças metabólicas, como o potencial eletroquímico, que dentro dos tumores é geralmente mais negativo do que no tecido normal circundante, particularmente no centro do tumor, favorecendo a formação de espécies no estado reduzido.^{12, 26-29}

A diminuição da carga sobre o centro metálico na redução de Ru(III) a Ru(II), onde há preenchimento nos orbitais dπ de simetria t_{2g}, faz com que ligantes π-doadores sejam mais facilmente substituídos.²⁵ A oxidação de Ru(II) de volta a Ru(III) pode ocorrer por oxigênio molecular, pela citocromo oxidase, ou outros oxidantes. Isso é menos provável de ocorrer em células tumorais em estado de hipóxia. Assim, o efeito do estado de hipóxia resulta no favorecimento da ligação de Ru(II) ao DNA e, conseqüente, intensificação da toxicidade desses agentes antitumorais. Esse efeito foi proposto para células HeLa (de câncer de colon) tratadas com *cis*-[Cl₂(NH₃)₄Ru]Cl.^{7, 25}

Além da linha de pesquisa focada na ativação de pró-fármacos baseados em Ru(III), um crescente estudo é voltado a complexos organometálicos de η⁶-

arenorutênio(II), onde o centro metálico já se encontra em estado reduzido pois o ligante areno de caráter π -aceitador, estabiliza o baixo estado de oxidação (+2).^{30, 31}

1.2. Complexos de η^6 -arenorutênio(II)

A síntese dos primeiros compostos organometálicos do tipo sanduíche deu-se no início da década de 1950, com o ferroceno (η^5 -C₅H₅)₂Fe de Pauson, sintetizado em 1951.³² A estrutura foi erroneamente atribuída por Pauson, mas um ano depois foi corretamente atribuída por Wilkinson e Woodward.³³ Depois da preparação do ferroceno, Wilkinson³⁴ sintetizou o correspondente derivado de rutênio. Em consequência desse trabalho pioneiro foi sintetizada uma grande quantidade de compostos do tipo sanduíche, que incorporaram ligantes ciclopentadieno com diferentes metais de transição.

Os primeiros complexos de η^6 -arenorutênio(II) foram propostos em 1957 por Fisher e Böttcher.³⁵ Primeiramente o complexo bis- η^6 -arenorutênio(II) foi sintetizado a partir de RuCl₃.*n*H₂O, benzeno, AlBr₃ e alumínio como redutor. Anos mais tarde, Bennet e Matheson³⁶ desenvolveram uma nova rota, que é adotada atualmente, com maior rendimento. O método de síntese baseia-se na reação de redução do RuCl₃ por um ciclodieno (Figura 1.3). Estudos posteriores de Zelonka e Baird³⁷ mostraram que esta reação leva a formação de um dímero que é estável e pode reagir com uma variedade de ligantes.

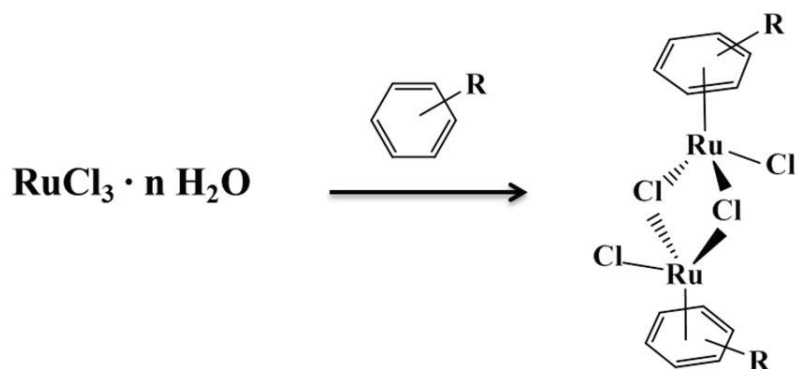


Figura 1.3. Reação atualmente empregada para a formação do $[(\eta^6\text{-areno})\text{ClRu}]_2\text{Cl}_2$. Adaptado de Therrien.³¹

Outra via sintética de complexos de η^6 -arenorutênio(II) envolve a troca dos ligantes arenos a temperatura elevada.³⁸ A troca desse ligante ocorre de forma gradual com o areno de entrada, sendo progressivamente removido da esfera de coordenação passando de η^6 , η^4 e η^2 , para, finalmente ser liberado, o que pode ocorrer antes ou concomitantemente a inserção do novo ligante areno (Figura 1.4).³¹

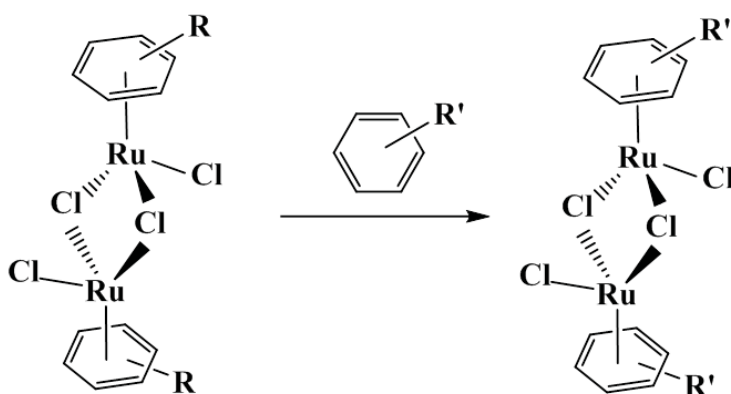


Figura 1.4. Reação para a formação de complexos de η^6 -arenorutênio(II) envolvendo a troca dos ligantes arenos. Adaptado de Therrien.³¹

Estes complexos são bastante atrativos devido à característica anfifílica da unidade η^6 -arenorutênio, o qual possui uma porção hidrofóbica no anel aromático balanceado pela porção hidrofílica situada no íon metálico, que deve proporcionar fácil absorção pelas células e interação com o material biológico. A presença do ligante aromático estabiliza e protege o centro metálico, prevenindo a oxidação de Ru(II) a Ru(III).^{39, 40} A ligação η^6 -areno-Ru (σ -doadora e π -aceitadora) confere a labilização do ligante oposto, que comumente se trata de cloreto. Diversos trabalhos são voltados para compostos organometálicos e/ou que utilizam substituições no anel aromático.^{41,42,35} Estes substituintes podem ser modificados e funcionalizados (Figura 1.5) para ajustar as propriedades dos complexos de areno-rutênio. Sendo que os três sítios de coordenação restantes opostos ao ligante areno podem ser utilizados para introduzir uma variedade de ligantes com átomos N-, O-, S- ou P- doadores.⁴³

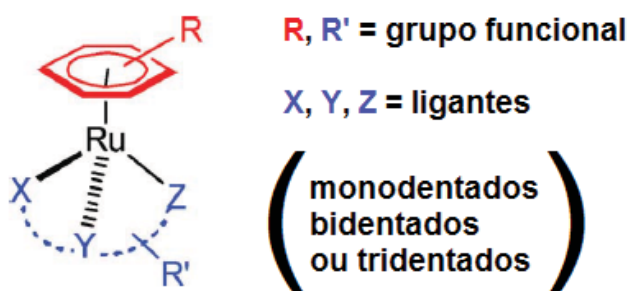


Figura 1.5. Inserção de funcionalidade de complexos de areno-rutênio. Adaptado de Smith *et al.*⁴⁴

No final da década de 1970 e início da década de 1980, Köpf e Köpf-Maier²⁻⁴ investigaram uma ampla gama de compostos metallocenos, em particular o dicloreto de titanoceno [Cp_2TiCl_2] (Cp= ciclopentadieno) que evoluiu como um candidato para ensaios clínicos.⁵ O primeiro composto de arenorutênio avaliado na ação antiproliferativa contra as células de tumores foi $\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{-(metronidazol)Cl}_2$ (metronidazol = 1- β -hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol). O complexo exibiu citotoxicidade

seletiva maior do que o próprio metronidazol (metronidazol é um antibiótico amplamente utilizado para tratar tumores causados por fungos), mas até o momento não foram divulgados novos estudos sobre as propriedades biológicas deste composto.⁴⁵

1.2.1. Complexos de η^6 -arenorutênio(II) como agentes antitumorais

Dyson¹⁰ e colaboradores descreveram uma série de estudos da avaliação das propriedades antitumorais de complexos de η^6 -arenorutênio(II), dos quais destaca-se o (η^6 -P-MeC₆H₄Pri)Ru(P-pta)Cl₂ (pta = 1,3,5-triaza-7-fosfa-triciclo[3.3.1.1]decano), denominado RAPTA-C. Esse composto exibiu uma atividade citotóxica muito baixa *in vitro* e geralmente livre de toxicidade para células normais, mesmo após exposição prolongada (72 horas) em altas concentrações (>1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). No entanto, os estudos revelaram que RAPTA-C é muito ativo *in vivo*, onde inibe a metástase pulmonar em camundongos. Como o NAMI-A, o RAPTA-C é também um agente antimetastático.^{7, 10, 46 8, 47}

A figura 1.6 ilustra alguns compostos derivados de η^6 -arenorutênio(II) todos com atividade antitumoral, com diferentes modos de ação. O complexo (η^6 -benzeno)Ru(DMSO)Cl₂ demonstrou inibir fortemente a atividade da enzima topoisomerase II, que é essencial na divisão celular. Além disso, o complexo apresentou atividade antiproliferativa *in vitro* em modelo de melanoma humano. O complexo [(η^6 -bifenil)Ru(en)Cl]⁺ (onde en = etilenodiamina) exibiu alta citotoxicidade *in vitro* em modelo de carcinoma de ovário, cólon e pâncreas, comparáveis a cisplatina.^{40, 48} A substituição do ligante etilenodiamina por acetilacetato aumenta significativamente o pKa do aquocomplexo devido ao aumento da densidade de elétrons no centro de rutênio. Foi demonstrado que o [(η^6 -bifenil)Ru(en)Cl]⁺ se liga preferencialmente a base guanina para formar adutos de DNA monofuncionais, enquanto que (η^6 -cimeno)Ru(acac)Cl (onde acac = acetilacetato) se liga as bases de

adenina e guanina^{9, 49, 50} Esses resultados poderiam levar a compostos projetados para direcioná-los às nucleobases específicas.

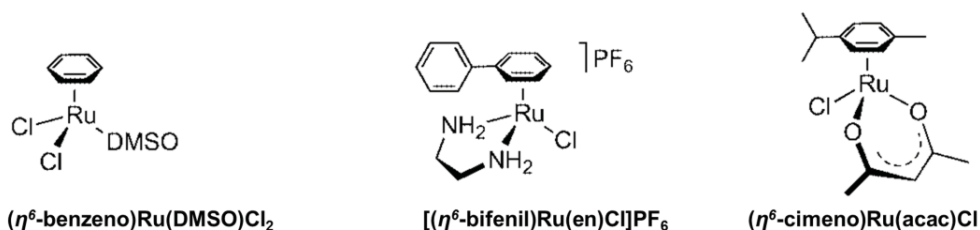


Figura 1.6. Exemplos de complexos organometálicos ($\eta^6\text{-areno}$) como agentes antitumorais. Adaptado de Han Ang *et al.*⁹

Os complexos $\eta^6\text{-arenorutênio(II)}$, de configuração d^6 spin baixo, podem ser relativamente inertes em relação às reações de substituição. Essa inércia é dependente do conjunto de ligantes na esfera de coordenação do rutênio. Por exemplo, Meggers *et al.*²⁴ reportou complexos com ligante carbonilo, que atuam como inibidores de quinases. Nesse caso, a ligação Ru-CO é bastante estável e não sofre hidrólise. Nesse estudo o composto inibe a ação da enzima sem sofrer mudanças estruturais.

Os complexos $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{XY})\text{Z}]^+$ (onde Z= ligante monodentado e XY=ligante quelante bidentado), sofrem ativação por hidrólise da ligação Ru-Z que pode ser um importante mecanismo de ação desta classe de drogas. Por exemplo, a hidrólise de $[(\eta^6\text{-arene})\text{-Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ é suprimido fora das células, uma vez que na corrente sanguínea existe uma alta concentração de íons cloreto ($103 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Já no meio intracelular, a concentração de íons cloreto é significativamente menor, aproximadamente $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, o que favoreceria a hidrólise.³⁰ Deste modo, a forma clorídrica do complexo pode predominar no meio extracelular, enquanto que os produtos de hidrólise, espécies aquo complexos ($\text{Ru-OH}_2/\text{OH}$) provavelmente prevalecerão dentro das células (Figura 1.7).⁵⁰ No entanto, se o pH do citoplasma for superior ao valor de pKa de hidrólise do complexo e substituição do ligante, formam-se complexos hidróxido (Ru-OH), que são menos susceptíveis à substituição por

biomoléculas, e estabilizam estados de oxidação mais elevados, facilitando a oxidação do centro metálico.⁷

Complexos com ligantes quelantes são geralmente mais estáveis em relação à substituição do ligante e é possível controlar a aquação (substituição do ligante lábil por água) pela escolha apropriada dos outros ligantes na esfera de coordenação. Da mesma forma, os efeitos tóxicos desta classe de complexos para células tumorais podem ser ajustados. Os complexos com ligantes quelantes *N,N*-doadores são mais ácidos que os com *N,O* e *O,O*-doadores. Consequentemente a maior acidez dos complexos com *N,N*-doadores levam a valores mais baixos de pK_a e a hidrólise ocorre em tempos mais longos. Como mostrado na figura 1.7, as taxas de hidrólise aumentam com ligantes quelantes doadores na ordem *N,N* < *N,O* < *O,O*.^{6, 50, 51}

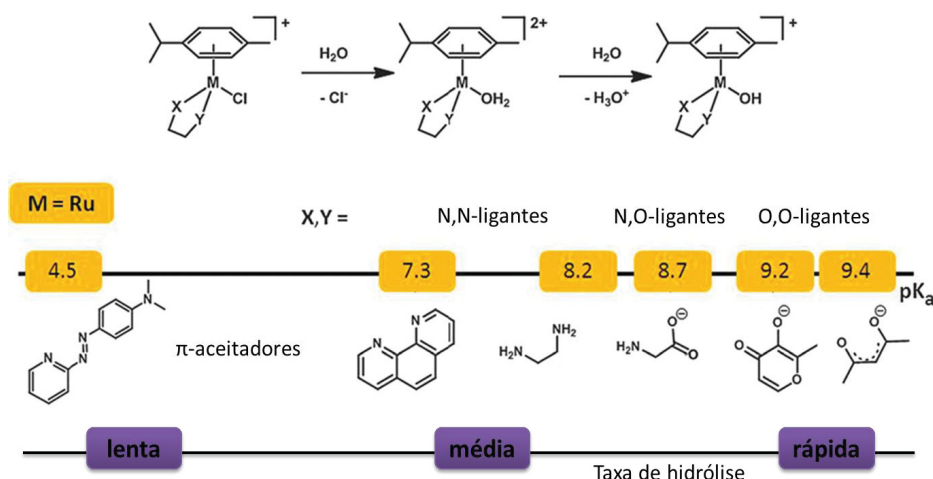


Figura 1.7. Hidrólise da ligação Ru-Cl nos complexos η^6 -arenorutênio, mostrando a dependência do ligante quelante. Os complexos contendo *N,N*-ligantes são mais ácidos e hidrolisam mais lentamente. Adaptado de Noffke et al.⁵⁰

Os complexos de η^6 -arenorutênio(II) com ligantes azopiridina, $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{azpy})\text{I}]^+$ (areno = *p*-cimeno ou bifenil e azpy = *N,N*-dimetilfenil- ou hidroxifenil-azopiridina), ao contrário dos mencionados acima não sofrem ativação por hidrólise, mas são citotóxicos para as células de câncer de pulmão e ovário.⁵² A presença do

substituinte doador de elétrons no grupo fenila (NMe_2 ou OH) é crítica para a atividade citotóxica. Os valores de pK_a do nitrogênio da piridina (protón NH) são baixos (azpy 2,47, azpy- OH 3,06 e azpy- NMe_2 4,60), sugerindo que eles são σ -doadores fracos. Isso, em conjunto com o comportamento π -aceitador dos ligantes fenilazopiridina, serve para aumentar a carga positiva sobre o rutênio e, juntamente com o ligante π -ácido η^6 -areno, explica parcialmente a ausência de hidrólise dos complexos azpy- NMe_2 e - OH .^{50, 52, 53} O mecanismo de ação desses complexos parece envolver a perturbação do equilíbrio redox nas células tumorais, evidenciado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio em células de câncer de pulmão humano.⁵³

Esses complexos com ligantes azopiridina podem sofrer ativação, através da redução do ligante por moléculas biorredutoras. Enquanto os ligantes de azopiridina sozinhos são difíceis de reduzir, os potenciais de redução são biologicamente acessíveis quando o ligante é coordenado à Ru(II) . Assim, o ajuste do ligante pode ser uma maneira possível de acelerar a redução e proporcionar pró-fármacos que podem sofrer ativação redox intracelular.^{50, 52}


Os ligantes azo, tais como 2-fenilazopiridina (azopy), que contém a ligação $\text{N}=\text{N}-\text{C}=\text{N}-$ possuem propriedades singulares. O anel piridínico é um π -aceitador intermediário e seu nitrogênio é um σ -doador fraco. O grupo azo tem baixa habilidade σ -doador para o metal, mas possui maior capacidade de π -aceitador através do orbital π^* do azo. Consequentemente, ligantes quelantes deste tipo são capazes de estabilizar metais em seus estados de oxidação mais baixos.⁵³ Por exemplo, o ligante azo foi relatado pela propriedade citotóxica de isômeros em vários complexos derivados de α - $[\text{Ru}(\text{azo})_2\text{Cl}_2]$ ($\alpha = \text{trans}$ -piridina, *cis* azo nitrogênios e *cis*-cloretos),⁵³ que se mostraram altamente ativos contra uma série de linhagens de células tumorais, com citotoxicidades comparáveis a cisplatina e atividades superiores em algumas linhagens de células. Outro ligante, contendo o grupo 1,3,4-oxadiazol, tem atraído uma grande atenção em busca de novas moléculas terapêuticas. Alguns agentes terapêuticos, tais como o antiretroviral Raltegravir, (Merck & Co.), o antibacteriano Furamizol, e os antihipertensivos Doxazosina e o Nesapidil são baseados no 1,3,4-oxadiazol.⁵⁴

A possibilidade de ancorar esses ligantes a complexos de η^6 -arenorutênio(II) possibilitam gerar novos complexos neutros ou carregados com propriedades

citotóxicas e, dependendo do ligante, anfífilas. Além disso, estes ligantes podem introduzir funcionalidades adicionais para a esfera de coordenação em volta do centro metálico, resultando num sinergismo, dando assim origem a multifuncionais metalofármacos em uma estratégia sintética econômica.^{43, 44}

1.3. Glioblastomas (GBM)

É cada vez mais crescente o número de novos casos de câncer no mundo, com base no documento Relatório de Câncer Mundial 2016 (*World Cancer Report*) da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS). É inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde se prevê, nas próximas décadas, mais de 20 milhões de novos casos, estimados para 2025. A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil novos casos) é previsto ocorrência de cerca de 420 mil novos casos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes (Figura 1.8).¹

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.8. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.¹

¹ Estimativa 2016/2017: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

No ano de 2016, estimam-se 5.440 novos casos de câncer do sistema nervoso central em homens e 4.830 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 para cada 100 mil mulheres. De todos os tumores malignos no mundo cerca de 2% correspondem ao câncer do sistema nervoso central. Grande parte dos tumores do sistema nervoso central origina-se no cérebro, nervos cranianos e meninges. Os gliomas são o tipo histológico mais frequente e representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do sistema nervoso central, sendo mais comum na faixa etária adulta.

Glioma é o termo genérico para tumores que surgem de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) e são subclassificados como astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, gliomas mistos, gliomas malignos não especificados e outras variantes histológicas raras. Os gliomas malignos são os cânceres mais frequentes e uniformemente fatais originados no sistema nervoso central. Segundo a OMS, os gliomas são classificados de acordo com sua malignidade, atribuindo graus de I a IV. O subtipo mais comum dentre os gliomas é o astrocitoma, sendo o astrocitoma de grau IV denominado glioblastoma.⁵⁵

O glioblastoma é o tipo histológico mais frequente e maligno, responsável por 65% dos gliomas, tem um pico de ocorrência em adultos com idade superior a 40 anos com predominância em homens. Apesar da crescente compreensão dos mecanismos oncológicos subjacentes à fisiopatologia e ao tratamento do GBM, apenas uma melhora insignificante na sobrevida global foi registrada durante a primeira década do século XXI.

Existem várias modalidades de tratamento atuais, incluindo a remoção cirúrgica, que às vezes não é possível, devido ao crescimento infiltrante das células de glioblastoma. Mesmo com o tratamento atual que inclui cirurgia, seguido de radioterapia e quimioterapia, a sobrevida é baixa. Os pacientes diagnosticados com glioblastoma tem sobrevida média entre 12 e 15 meses, e a taxa de sobrevivência de cinco anos para os pacientes é inferior a 5%.⁵⁶ A agressividade de células de glioma pode ser atribuída à sua elevada taxa de proliferação, migração e invasão.⁵⁷ Apesar

dos avanços em vários esquemas de tratamento, o tratamento de gliomas permanece um desafio para os oncologistas.⁵⁸

1.3.1. Diagnóstico e tratamento para glioblastomas

Pacientes com gliomas malignos podem apresentar uma variedade de sintomas neurológicos que podem ser generalizados ou de natureza focal. Os sintomas generalizados incluem dores de cabeça, vômitos, alterações visuais e convulsões.⁵⁹ As dores de cabeça ocorrem em aproximadamente 50% dos pacientes com gliomas malignos. Eles podem ser um sintoma de pressão intracraniana elevada do efeito de massa tumoral, edema, hidrocefalia ou hemorragia associada ao tumor. Aproximadamente 18% dos pacientes com GBM inicialmente apresentam convulsões. Alguns déficits focais foram encontrados de forma anatômica com regiões específicas do cérebro. Por exemplo, os tumores do lobo frontal podem estar associados a mudanças de personalidade e demência, enquanto que as lesões do lobo parietal são frequentemente associadas à insuficiência sensorial.⁸

A terapia padrão para glioblastoma inclui temozolomida, um derivado de imidazoltetrazina, que exerce os seus efeitos citotóxicos pela metilação de locais específicos no DNA.⁶⁰ A metilação na posição O⁶ da guanina no DNA é geralmente considerada a mais crítica, resultando na fragmentação e perturbando a replicação do DNA, causando a supressão tumoral e apoptose.⁶¹ A temozolomida é tomada por via oral e é absorvida rapidamente, com uma biodisponibilidade quase completa após a administração oral, atravessando a barreira hematoencefálica e atingindo uma alta concentração no líquido cefalorraquidiano.⁶¹ O líquido cefalorraquidiano é circundante no espaço intracraniano, atua fornecendo nutrientes indispensáveis para o cérebro, protege mecanicamente as células cerebrais e remove resíduos metabólicos do sistema nervoso.^{8, 62}

O efeito citotóxico da temozolomida está correlacionado com os níveis intracelulares da enzima O⁶-alquil-guanina alquiltransferase, que pode reparar a metilação no DNA, transferindo o grupo metila para um resíduo interno da cisteína.

Assim, níveis elevados dessa enzima são responsáveis por conferir resistência a temozolomida. A cisplatina mostrou reduzir a atividade da O⁶-alquil-guanina alquiltransferase *in vitro*. Deste modo, a adição de cisplatina em conjunto a temozolomida pode ser uma opção a pacientes que não respondem mais ao tratamento com o quimioterápico isolado.^{63, 64}

1.3.2. Mecanismo de resistência a drogas

Os maiores obstáculos no uso de quimioterápicos para tratamento do glioblastoma é a resistência ao tratamento pelo fármaco. Esse fenômeno de resistência é conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) e pode estar relacionado a uma série de fatores que não são plenamente compreendidos. Os principais fatores envolvidos no fenótipo MDR são a permeabilidade seletiva da barreira hematoencefálica, o transporte da droga através da membrana plasmática, alteração nos níveis de expressão de proteínas alvos, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade para sofrer apoptose.^{65, 66}

A barreira hematoencefálica é uma interface seletivamente restritiva entre o sistema vascular e o sistema nervoso central que mantém a homeostase do cérebro regulando o ambiente químico, o transporte de células imunitárias e a entrada e disposição de xenobióticos. Essa é formada por células endoteliais, cercadas por uma membrana basal e as extremidades perivasculares astrocíticas (Figura 1.8). A ação da barreira hematoencefálica na proteção do sistema nervoso central à exposição de substâncias químicas circulantes é mantida por uniões verticais presentes entre as células endoteliais cerebrais que formam uma barreira de difusão e por uma variedade de proteínas transportadoras no exterior, que regulam o intercâmbio entre o sistema nervoso central e o sangue.⁶⁷

Os glioblastomas podem estar localizados em diferentes regiões no cérebro, sendo caracterizado por diferenças na integridade da barreira hemato-encefálica. Em áreas de tumores volumosos (painel esquerdo, figura 1.8) a barreira hematoencefálica

é bastante comprometida. Em regiões de células tumorais invasivas, na periferia do tumor volumoso (painel central, figura 1.8), ocorre infiltrações na barreira hematoencefálica. Já em regiões invasivas distantes do tumor volumoso (painel direito, figura 1.8) a barreira hemato-encefálica se encontra intacta. Onde a barreira hematoencefálica está comprometida as macromoléculas e substâncias neurotóxicas podem atingir as células de glioma, enquanto que a barreira hematoencefálica intacta protege células tumorais isoladas contra entrega de agentes terapêuticos. Esta proteção tem fortes implicações para a eficácia do tratamento antitumoral, especialmente considerando o fato de que essas regiões não são ressecáveis e muitas vezes dão origem a tumores recorrentes.⁵⁹

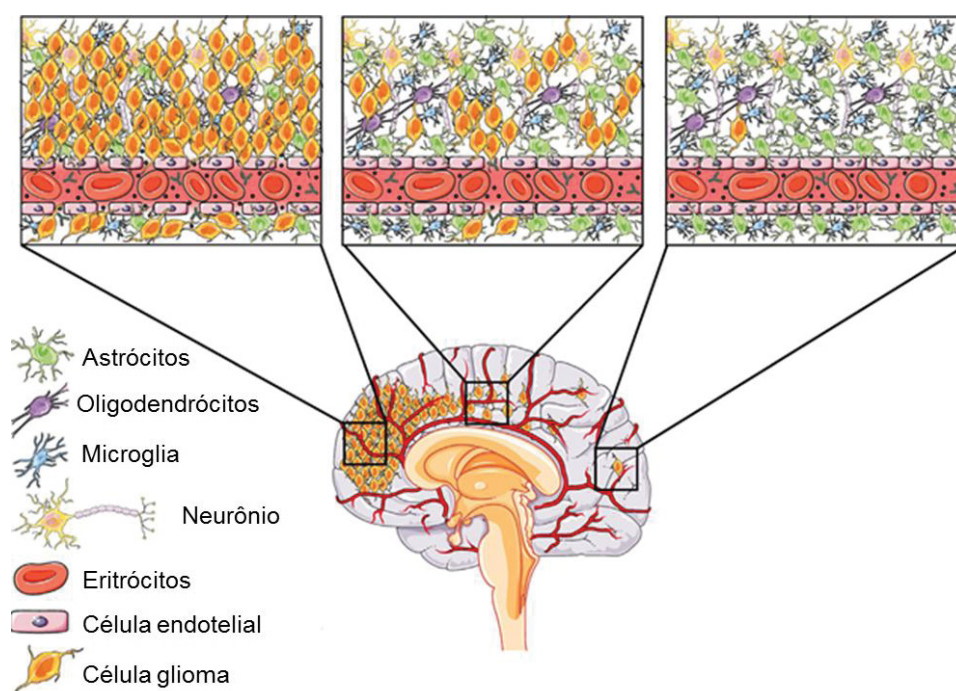


Figura 1.9. Glioblastoma em diferentes regiões do cérebro, caracterizadas por vários graus de integridade da barreira hemato-encefálica. Adaptado de van Tellingen *et al.*⁵⁹

Estima-se que proteínas transportadoras constituam 10-15% de todas as proteínas na unidade neurovascular, interface funcional entre o sistema nervoso central e o sistema vascular. Quatro tipos de proteínas de transporte são expressos na barreira

hematoencefálica: canais de íons, transportadores de soluto, aquaporinas e bombas de efluxo alimentadas por adenosina trifosfato (ATP). Essas proteínas regulam a presença de grande número de toxinas no interior das células, bem como agentes terapêuticos e contribuem para o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.^{59, 67, 68}

A presença das bombas de efluxo é uma das principais formas de MDR, que se dá pela maior expressão de proteínas transportadoras da superfamília ABC (*ATP-binding cassette*)⁶⁹ em células tumorais, que utiliza a energia gerada pela hidrólise de ATP em ADP (adenosina-difosfato) para transportar uma ampla gama de substratos endógenos e exógenos através da membrana, contra um gradiente de concentração.⁷⁰⁻⁷³ Isso reduz o acúmulo intracelular de drogas, reduzindo assim o efeito terapêutico. As principais proteínas transportadoras ABC responsáveis pela MDR incluem a proteína de resistência ao câncer de mama (ABCG2), glicoproteína-P (P-gp) e membros da família de proteínas associada à MDR (MRP1).⁷⁴

1.3.3. Proteínas transportadoras da superfamília ABC

Os transportadores ABC constituem uma grande família de proteínas, e estão presentes em diferentes organismos como arqueobactérias, procariotos e eucariotos.⁷⁵ Os membros da família ABC são proteínas transmembranares (proteínas que atravessam a membrana celular, possuindo uma porção no interior da célula e outra no exterior) capazes de transportar diversos substratos através da membrana celular, com gasto de energia.^{76, 77}

Em 1973, Dano⁷⁸ demonstrou que células de carcinoma de Erlich resistentes a daunomicina apresentavam menor concentração intracelular deste composto, quando comparado ao carcinoma não resistente, sugerindo que a MDR seria consequência da ação de transportadores celulares.⁷⁹ Três anos mais tarde, foi identificada a primeira bomba de efluxo de drogas, pertencente à superfamília ABC, relacionada com o fenótipo MDR.⁷⁹

Até o momento, 49 membros da superfamília de transportadores ABC foram identificados em seres humanos.⁸⁰⁻⁸² Desses apenas 15 são descritos como transportadores de quimioterápicos em sistemas *in vitro*,⁸⁰ sendo que os transportadores P-gp, MRP1 e ABCG2 apresentaram uma forte relevância clínica por acelerar o efluxo de múltiplas drogas, estando envolvidos diretamente na resistência a quimioterapia.^{77, 79, 83}

O primeiro membro identificado da superfamília ABC foi o transportador P-gp, superexpresso em linhagens celulares de ovário de hamster chinês resistentes a colchicina.⁸⁴ Anos mais tarde foram identificados mais dois transportadores, MRP1 em linhagens de câncer de pulmão resistentes a doxorubicina⁸⁵ e ABCG2 em câncer de mama resistente a adriamicina.^{79, 86}

Estruturalmente, as proteínas transportadoras ABC apresentam um domínio transmembranar e um domínio de ligação a nucleotídeos. Os domínios de ligação a nucleotídeos são responsáveis pela ligação e hidrólise de ATP, fornecendo energia para a translocação ou efluxo de substratos fisiológicos e xenobióticos do citoplasma para o espaço extracelular. Os domínios transmembranares podem determinar as características do transporte dos substratos.^{79, 87} Vale destacar que P-gp e MRP1, que apresentam dois ou três domínios transmembranares, são considerados transportadores completos (Figura 1.10), e no caso de ABCG2, que apresenta apenas um domínio transmembranar, é descrito como meio-transportador, capaz de formar um homodímero de forma a constituir o transportador completo (Figura 1.10).⁷⁷

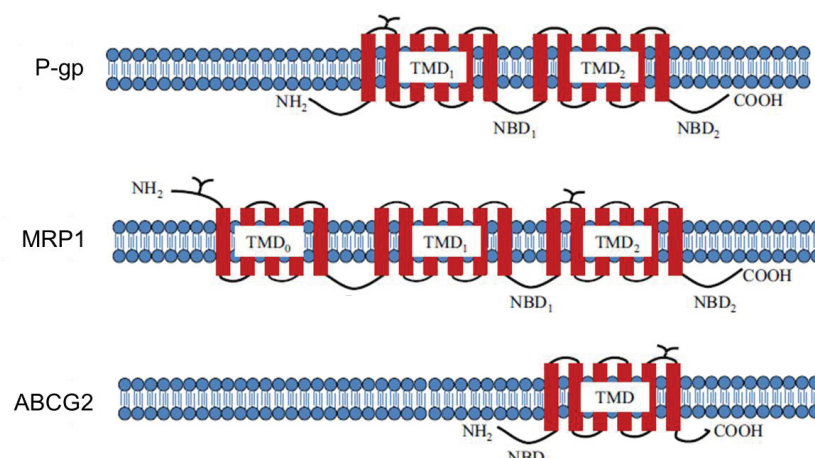


Figura 1.10. Modelos de estrutura secundária de transportadores de substratos de drogas da família de cassete de ligação de ATP. TMD = domínio transmembranar; NBD = domínio de ligação a nucleotídeos. Adaptado de Chen *et al.*⁸⁷

As interações físico-químicas responsáveis pela ligação do substrato e o mecanismo de translocação do substrato mediada pelos transportadores ABC ainda não estão completamente compreendidos.⁸⁸ No entanto, é conhecido que ATP desempenha um papel importante no efluxo de substratos pelos transportadores ABC. A ligação de duas moléculas de ATP na interface do dímero pode induzir mudanças na conformação do domínio transmembranar levando assim à dimerização e configuração de um domínio de ligação a nucleotídeos parecidos com um sanduíche. Quando um substrato se liga ao domínio transmembranar, promove uma diminuição da energia de ativação para a dimerização de domínio de ligação a nucleotídeos. O ATP ligado a molécula é hidrolisado para ADP e um fosfato inorgânico, que separa os domínios de ligação a nucleotídeos, então o substrato é liberado no espaço extracelular e restaura o estado conformacional estável do domínio de ligação a nucleotídeos, que está pronto para a ligação e transporte de outro substrato (Figura 1.11).^{87, 89}

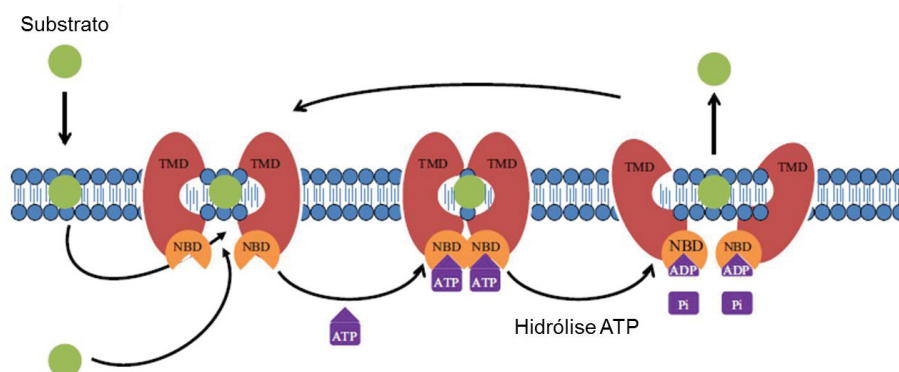


Figura 1.11. Função dos transportadores ABC. Transportadores ABC são transportadores dependentes de ATP; eles exibem uma mudança conformacional após a ligação do substrato e a hidrólise do ATP que conduz o processo de transporte do substrato. TMD=domínio transmembranar; NBD=domínio de ligação a nucleotídeos; Pi=fosfato inorgânico. Adaptado de Chen *et al.*⁸⁷

Foi estabelecido que P-gp, MRP1 e ABCG2 são capazes de transportar uma ampla gama de substratos.⁹⁰ Os substratos reconhecidos são normalmente compostos hidrofóbicos, mas também cátions e ânions, que não apresentam traços estruturais comuns. O transporte de substratos por proteínas ABC vai além da resistência a quimioterápicos (MDR). Estes têm importantes funções fisiológicas na detoxificação celular, protegendo o cérebro, fígado, rins e outros órgãos de quaisquer substâncias tóxicas produzidas no metabolismo.⁹¹

A proteína transportadora P-gp possui uma massa molecular de 170 KDa. Está localizada em diferentes tecidos do organismo, estando localizada normalmente na membrana apical de células epiteliais, no qual apresenta função de secreção e proteção celular.^{83, 91, 92} Os substratos de P-gp incluem classes químicas completamente diferentes, como drogas hidrofóbicas neutras e catiônicas incluindo taxanos (paclitaxel e docetaxel), alcalóides de Vinca (vinblastina e vincristina), antraciclinas (doxorubicina e daunorubicina), etc.^{69, 83, 87, 92, 93}

A proteína MRP1 possui massa molecular de 190 kDa, está presente na superfície basolateral da membrana epitelial e transporta várias substâncias aniônicas endógenas e exógenas, tais como antracinas (doxorubicina, daunorubicina,

epirubicina), alcalóides Vinca, epipodofilotoxinas, camptotecinas, metotrexato, saquinavir e mitoxantrona, etc.^{83, 94} A principal característica da proteína MRP1 é transportar glutathione (GSH) na forma livre, bem como na forma conjugada.⁹⁵ A proteína parece conter duas regiões, uma para moléculas anfífilas com propriedades semelhantes aos substratos de P-gp e um segundo local mais hidrofílico, para substratos conjugados com glutathione.^{96, 97}

A proteína ABCG2 é uma proteína de massa molecular de 72 kDa, que nos tecidos humanos normais, ABCG2 é predominante na membrana plasmática de diferentes tecidos, como o epitélio do intestino delgado e do cólon, fígado, lóbulos de tecido mamário.⁷⁴ Além de apresentar funções fisiológicas importantes, é capaz de transportar uma grande quantidade de substrato catiônicos e aniônicos, incluindo os conjugados de sulfato e glicuronídeo, antraciclinas, inibidores de topoisomerase I, metotrexato, etc.^{68, 83, 92, 93}

1.4. Expressão de transportadores ABC em gliomas

A absorção de drogas no cérebro é dependente de uma variedade de fatores, incluindo a barreira física apresentada pela barreira hematoencefálica, barreira de fluídos sangue-cerebrospinal e a afinidade do substrato para as proteínas transportadoras ABC localizados em ambas as barreiras.^{59, 67, 68} Portanto, é o efeito agregado desses fatores que determina a exposição cerebral total e, portanto, a eficácia farmacológica, de um fármaco ou candidato a fármaco.^{98, 99}

A expressão de P-gp no cérebro foi encontrada em numerosas espécies, incluindo humanos, primatas, ratos, camundongos e porcos.¹⁰⁰ É localizada, principalmente, na membrana luminal (apical) de células endoteliais capilares do cérebro de mamíferos e humanos.¹⁰¹ Assim, os medicamentos que são substratos de P-gp quando entram nas células endoteliais são imediatamente bombeadas de volta ao sangue. Como consequência, a penetração de substrato e outros compostos do sangue para o tecido cerebral pode diminuir drasticamente.^{100, 102, 103}

Como P-gp, as proteínas MRPs (MRP1-9) estão localizadas em vários tecidos, incluindo barreira hematoencefálica e a barreira de fluídos sangue-cerebrospinal. Algumas MRPs, como a MRP2, estão localizadas em membranas celulares apicais, enquanto que outros MRPs, como MRP1, MRP3 e MRP5, estão situados na membrana basolateral. A expressão de MRPs no cérebro em células endoteliais que formam a barreira hematoencefálica é relatada para várias espécies, incluindo humanos.¹⁰⁴

No cérebro, o ABCG2 foi detectada nas células do endotélio capilar de porcos, ratos, e humanos, principalmente na superfície luminal. Portanto, a modulação dos transportadores ABC na barreira hematoencefálica forma uma nova estratégia para melhorar a penetração de drogas no cérebro e pode render novas opções terapêuticas para doenças do sistema nervoso central resistentes aos fármacos.^{59, 67, 68, 105, 106}

Caratozzolo *et al.*¹⁰⁵ investigaram a expressão de P-gp, MRP1, MRP3 e MRP5 em pacientes com gliomas malignos. Os resultados mostraram níveis de expressão altos de MRP1, intermediários de MRP5 e baixos de MRP3 e P-gp em comparação com células cerebrais não tumorais. Declèves *et al.*¹⁰⁷ também mostraram a expressão de MRP1 e MRP3 em pacientes com glioblastomas, no entanto, não detectaram a expressão de P-gp. Esses estudos sugerem que em 70% dos casos de glioblastomas a resistência intrínseca às drogas é regulada principalmente pela superexpressão de MRP1.^{105, 106, 108} A expressão de ABCG2 em gliomas foi demonstrado por Bleau *et al.*^{109, 110} na barreira hematoencefálica de células endoteliais.

1.4.1. Relação entre o transportador MRP1 e GSH

A GSH é o antioxidante mais abundante presente na célula, constituído por um tripeptídeo (γ -Glu-Cys-Gly), sendo carregada negativamente em pH fisiológico e é frequentemente envolvida em processos de desintoxicação através de espécies conjugadas, diferenciação celular, proliferação e apoptose.¹⁵

A atividade antioxidante da glutatona promove a redução de espécies oxidantes, como peróxido de hidrogênio, e consequente oxidação da GSH à glutatona

dissulfeto (GSSG) catalisada pelas enzimas glutathione peroxidase e glutathione oxidase. A regeneração de GSSG para GSH ocorre pela ação da enzima glutathione reductase na presença de NADPH (Figura 1.12).

A relação de quantidade GSSG / 2GSH determina principalmente o estado redox de uma célula, pois determina o potencial redox do par GSSG / 2GSH. De acordo com Schafer *et al.*¹¹¹ a proporção da quantidade GSSG / 2GSH correlaciona-se com o estado biológico da célula. As células que se encontram no estágio de proliferação exibem uma grande concentração de GSH e um potencial eletroquímico mais reduzido, apresentando um potencial redox $E \sim -240$ mV. As células em diferenciação apresentam um pouco mais positivo em função do aumento na proporção GSSG / 2GSH e um $E \sim -200$ mV. A diminuição das quantidades de GSH e consequente aumento da relação GSSG / 2GSH em níveis que alcancem $E \sim -170$ mV provocam um desbalanço redox na célula que pode entrar em colapso e induzir um processo de apoptose.

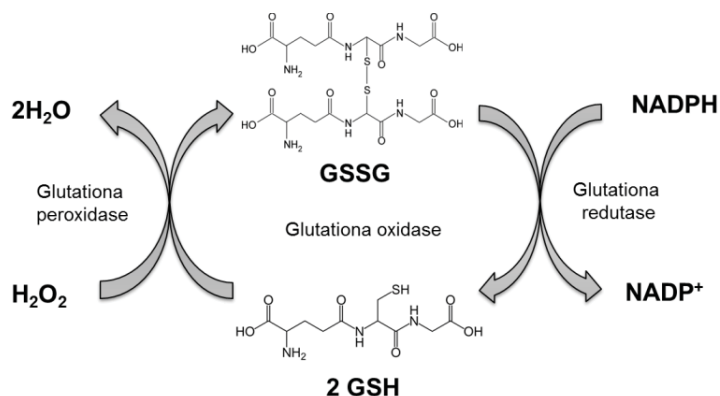


Figura 1.12. Representação esquemática do ciclo catalítico da glutathione.

Como discutido no item 1.4, o transportador MRP1 reconhece e transporta vários agentes antitumorais hidrofóbicos e hidrofílicos, mas alguns desses compostos são transportados por MRP1 quando conjugados com GSH, como vincristina, doxorubicina, etoposide e mitoxantrona, assim o número de substratos que podem ser efluxados por MRP1 é bastante amplo.^{97 96}

Cole *et al.*⁹⁶ relataram o transporte de GSH e GSH conjugados com drogas por MRP1. A vincristina e a doxorubicina são exemplos de compostos que requerem GSH

para serem transportado por MRP1. O transporte de um pequeno número de ânions orgânicos conjugados também é observado apenas na presença de GSH. No entanto, nestes casos, parece que GSH apenas estimula o processo e não é transportado juntamente com o substrato.^{96, 97, 112} Porém, alguns trabalhos mostram que o nível de GSH tende a ser mais baixo em células que superexpressam MRP1, reduzindo a capacidade antioxidante podendo tornar as células mais suscetíveis aos estímulos apoptóticos.⁹⁷

No entanto, ainda não está claro porque GSH estimula o transporte de alguns substratos por MRP1. Existe atividade de GSH atribuída à doação de prótons do grupo tiol (SH) do resíduo de cisteína, porém este não é o efeito estimulante sobre o transporte mediado por MRP1. O resíduo de cisteína substituído por um grupo metila (γ -Glu-Abu-Gly), um grupo fenila (γ -Glu-Phe-Gly), um grupo S-metila (γ -Glu-S-metil-Cys-Gly) ou um grupo hidrofóbico não aromático (γ -Glu-Leu-Gly) continua a estimular o transporte mediado por MRP1. Atualmente, é proposto que GSH induz uma mudança conformacional na proteína MRP1, favorecendo a ligação dos substratos cujo transporte é reforçado por esse tripeptídeo.^{96, 97, 112, 113}

O transportador MRP1 também efluxa GSSG, a forma dimérica oxidada de GSH, pois GSSG tende a se acumular nas células em condições de estresse oxidativo.¹¹⁴ Por causa de atividades deletérias e pró-oxidantes, a manutenção de baixos níveis de GSSG é importante para a função celular normal.¹¹⁵ Esta manutenção é realizada principalmente por uma combinação da redução do GSSG de volta para GSH pela glutathione redutase e pelo seu efluxo por MRP1 e MRP2. O efluxo de GSSG mediado por MRP1 é particularmente importante na manutenção de astrócitos saudáveis, miócitos, células endoteliais e principalmente para a homeostase celular redox.^{112, 97, 114, 115}

Exemplos da relevância clínica do papel de MRP1 no estresse oxidativo e na homeostase redox incluem um estudo recente que implicou MRP1 como um fator neuroprotetor contra acidentes vasculares cerebrais e atribuiu essa capacidade ao transporte de GSSG mediado por MRP1, um gatilho conhecido da morte das células neurais.¹¹² A proteína MRP1 também está envolvida na função e sobrevivência das

células progenitoras endoteliais e, portanto, tem sido implicada na regeneração do endotélio após danos vasculares.¹¹⁴⁻¹¹⁶

1.5. Justificativa do projeto de estudo

Os complexos η^6 -arenorutênio(II) representam uma importante classe de compostos no desenho de novos metalofármacos podendo ter suas propriedades moduladas de acordo com o grupo de ligantes coordenados. Uma das principais características relatadas, a anfifilicidade da porção η^6 -arenorutênio, a qual favorece a biocompatibilização, pode ser intensificada nos complexos a partir da coordenação de ligantes de cadeia longa, os quais já apresentam por si essa característica anfifílica. Deste modo, uma das peças iniciais que compõem este estudo foi o desenho de ligantes onde a cadeia alifática foi modificada de modo a obter complexos com anfifilicidade modulada. Como discutido no item 1.2.1. complexos de η^6 -arenerutênio(II) contendo ligantes azopiridina foram relatados na literatura como promissores antitumorais⁵², em que o forte caráter π -aceitador do grupo azopy estabiliza o centro de rutênio no estado reduzido, porém as reações de substituição e aquação são suprimidas devido a alta acidez do ligante. Deste modo, ligantes anfifílicos contendo grupos fenilazopiridina foram desenhados a partir de dois isômeros *orto* e *para*-substituídos. Estes isômeros se coordenam de forma mono- e bidentada ao rutênio. Além de modular a densidade de carga sobre o centro metálico, eles produzem complexos neutros e catiônicos, os quais têm diferentes propriedades de interação com membranas celulares. A fim de comparação com os complexos derivados de fenilazopiridina, ligantes baseados em feniloxadiazopiridina também foram desenhados. É conhecido que moléculas contendo grupos feniloxadiazó atuam como antibacterianos.⁵⁴

Considerando a importância do GBM, devido a sua frequência, agressividade e baixa sobrevida dos pacientes, esse modelo de tumor foi escolhido no nosso estudo.

Além disso, não há relatos na literatura de estudos envolvendo complexos de η^6 -arenorutênio(II) como antitumorais em GBM.

Como discutido no item 1.4.1., os obstáculos no tratamento de GBM incluem fatores associados à MDR, sendo a presença de bombas de efluxo, isto é, a superexpressão das proteínas transportadoras ABC, responsáveis pela diminuição do acúmulo intracelular do fármaco e redução do efeito terapêutico. Assim, uma parte do estudo foi voltada para verificar o comportamento dos nossos compostos anfífilos de η^6 -arenorutênio(II) frente a alguns transportadores ABC de maior relevância terapêutica, uma vez que não há relatos na literatura envolvendo essas proteínas de efluxo e metalofármacos.

Capítulo 2:

Objetivos

Capítulo 2 - Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar compostos de fenilazo e feniloxadiazo de η^6 -arenorutênio(II) neutros e catiônicos e avaliar o potencial efeito citotóxico em células de glioma humano. Primeiramente, sintetizar dois grupos de compostos, grupo I com ligantes fenilazo e grupo II com ligantes feniloxadiazo, com diferenças como a carga do composto e a hidrofobicidade. Segundo, avaliar o potencial efeito citotóxico dos compostos η^6 -arenorutênio(II) através da investigação de atividade metabólica, progressão das células pelo ciclo celular e avaliar o papel desses compostos no fenótipo de resistência ao tratamento por quimioterápicos devido à superexpressão do transportador ABC.

2.2. Objetivos específicos

Para atingir esta meta os objetivos específicos foram:

- Sintetizar e purificar os complexos de η^6 -arenorutênio(II) com os ligantes:
 - 4-(4'-dodeciloxifenilazo)piridina (**L1a**);
 - 4-(4'-metoxifenilazo)piridina (**L1b**);
 - 2-(4'-dodeciloxifenilazo)piridina (**L2a**);
 - 2-(4'-metoxifenilazo)piridina (**L2b**);
 - 4-{(4-dodeciloxifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina (**L3a**);
 - 4-{(4'-metoxifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina (**L3b**);
 - 2-{(4-dodeciloxifenil)-1,3,4-oxidiazol-2-il}piridina (**L4a**);
 - 2-{(4'-metoxifenil)-1,3,4-oxidiazol-2-il}piridina (**L4b**).

- Caracterizar os compostos por espectroscopia FTIR, UV-vis, MS-ESI, RMN de ^1H e voltametria cíclica.
- Investigar a atividade biológica em linhagens de glioma humano T98G, U87MG e U251 através de ensaios de citotoxicidade, análises da progressão do ciclo celular e indução de fragmentação de DNA.
- Avaliar o desempenho dos compostos de arenorutênio(II) em relação aos principais transportadores de multidroga pertencentes à família ABC (Pgp, MRP1 e ABCG2).

Capítulo 3:

Materiais e Métodos

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Reagentes e Solventes

Todos os reagentes e solventes empregados possuem grau analítico e foram adquiridos de fontes comerciais (Merck, Sigma-Aldrich, Fluka e Acros) e utilizados sem tratamento prévio. Meio DMEM alta glucose e soro fetal bovino (FBS) (Invitrogen) foram adquiridos da Cultilab. Os ligantes utilizados nas sínteses foram cedidos pelo Prof. Dr. Eduard Westphal (UTFPR) e Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo (UFSC). O composto **3a** e **4a** foram sintetizados pela Dra. Denize Maria Hoffmeister, que constituiu parte de sua tese de doutorado desenvolvida no nosso grupo de pesquisa.

3.2. Sínteses

A síntese do precursor $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}]_2\text{Cl}_2$ ^{37, 117} (η^6 -arenorutênio(II)) foi realizada através da dissolução de 0,85g (4,1mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 50mL de etanol, em um balão de 100mL. Em seguida, adicionou-se 3mL de 1,3-ciclohexadieno. A solução foi deixada sob refluxo durante 4 horas a 45°C. O produto de cor castanho foi isolado por filtração, lavado com metanol e etanol e seco sob vácuo. Obteve-se um rendimento de 45% (Figura 3.1).

As sínteses dos compostos **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a** e **4b** estão descritas a seguir e suas estruturas são mostradas na Tabela 3.1.

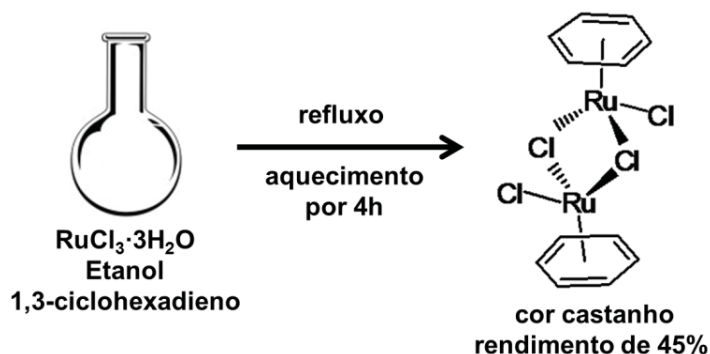


Figura 3.1. Esquema ilustrativo para a síntese do complexo precursor $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}]_2\text{Cl}_2$.

3.2.1. Síntese dos compostos 1a, 1b, 3a e 3b (complexos neutros)

Em um balão de fundo redondo de 100mL, adicionou-se 0,1g (0,2mmol) de precursor $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}]_2\text{Cl}_2$ e 0,15g de ligante em quantidade estequiométrica $\text{L}:[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}]_2\text{Cl}_2(2:1)$, em 20mL de tetrahidrofurano (THF), mantido sob refluxo por 6 horas. Em seguida, a mistura foi resfriada até temperatura ambiente. Após isso, foi adicionado uma sobrecamada de etanol, cerca de 10mL, para precipitar o produto, que foi mantido sob refrigeração por 12 horas. Por fim o produto foi filtrado e lavado com etanol e THF, seco sob vácuo (Figura 3.2). A purificação destes compostos foi realizada através da lavagem das amostras com diclorometano, seguida pela filtragem das mesmas em Celite, este procedimento foi realizado por 3 vezes, eliminando o excesso de precursor da amostra. Após foi realizada a lavagem das amostras com THF, para remover o excesso de ligante.

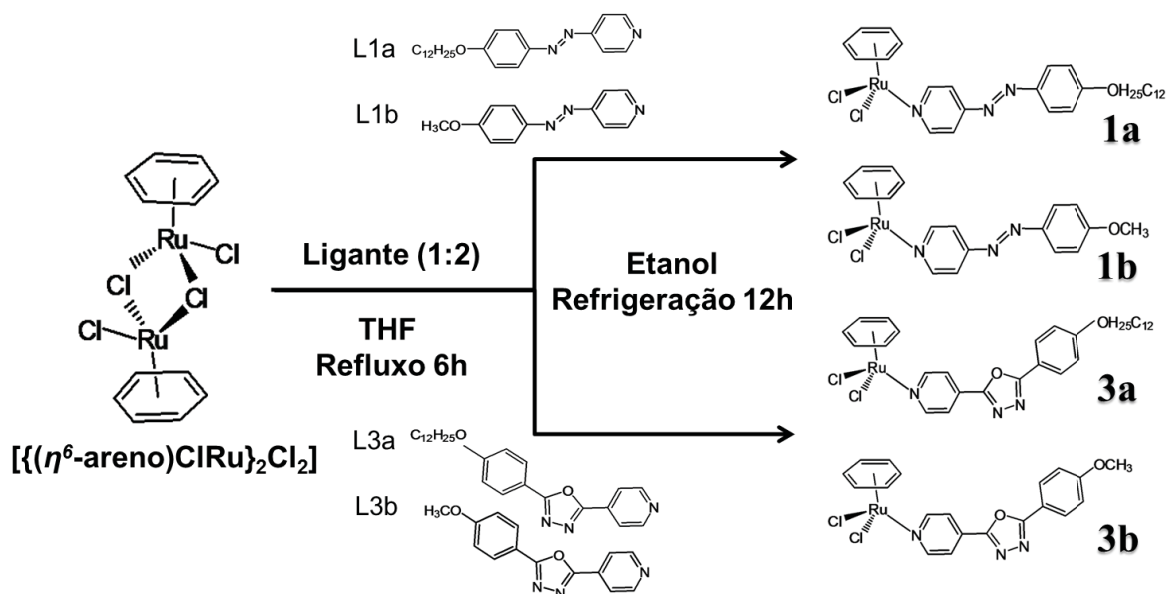


Figura 3.2. Esquema ilustrativo para a síntese dos compostos neutros **1a**, **1b**, **3a** e **3b**.

Composto 1a: Sólido laranja. Rendimento 16,6%. CHN: $\text{RuON}_3\text{Cl}_2\text{C}_{29}\text{H}_{39} \cdot \text{H}_2\text{O}$ experimental (calculado): %C: 55.6 (54.8), %H: 6.3 (6.5), e %N: 7.0 (6.6). Pureza 99.94%. ^1H RMN: (200MHz, 30°C, CDCl_3 , TMS) δ ppm: 0.88 (3H, H_1), 1.27 (16H, H_2), 1.48 (2H, H_3), 1.83 (2H, H_4), 4.08 (2H, H_5), 5.70 (6H, H_{10}), 7.03 (2H, $\text{H}_{6,6'}$), 7.67 (2H, $\text{H}_{8,8'}$), 7.97 (2H, H_7 , γ'), 9.21 (2H, $\text{H}_{9,9'}$). IR (KBr) ($\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$): 3066, 2924 e 2853 (ν_{CH}), 1599 (ν_{CC}), 1497 e 1412 (ν_{CN}), 1254 (ν_{asCOC}), 1146 (δ_{CH}), 1015 (ν_{sCOC}), 832 (π_{CH}) e 564 (π_{CC}).

Composto 1b: Sólido amarelo. Rendimento 21,0%. CHN: $\text{RuON}_3\text{Cl}_2\text{C}_{18}\text{H}_{17} \cdot \text{H}_2\text{O}$ experimental (calculado): %C: 45.6 (44.9), %H: 3.7 (3.9), e %N: 8.7 (8.7). Pureza 99.94%. ^1H RMN: (200MHz, 30°C, CDCl_3 , TMS) δ ppm: 3.93 (3H, H_1), 5.69 (6H, H_{10}), 7.04 (2H, $\text{H}_{6,6'}$), 7.68 (2H, $\text{H}_{8,8'}$), 7.99 (2H, H_7 , γ'), 9.22 (2H, $\text{H}_{9,9'}$). IR (KBr) ($\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$): 3066 (ν_{CH}), 1599 (ν_{CC}), 1499 e 1410 (ν_{CN}), 1258 (ν_{asCOC}), 1144 (δ_{CH}), 1023 (ν_{sCOC}), 832 (π_{CH}) e 562 (π_{CC}).

Composto 3a: Sólido amarelo. Rendimento 34,5%. CHN: $\text{RuO}_2\text{N}_3\text{Cl}_2\text{C}_{31}\text{H}_{39}\cdot\text{H}_2\text{O}$ experimental (calculado): %C: 56.1 (55.1), %H: 6.0 (6.1), e %N: 6.4 (6.2). Pureza 99.92%. ^1H RMN: (200MHz, 30°C, CDCl_3 , TMS) δ ppm: 0.88 (3H, H_1), 1.27 (16H, H_2), 1.48 (2H, H_3), 1.83 (2H, H_4), 4.05 (2H, H_5), 5.72 (6H, H_{10}), 7.05 (2H, $\text{H}_{6,6'}$), 7.99 (2H, $\text{H}_{8,8'}$), 8.08 (2H, H_7 , τ'), 9.32 (2H, $\text{H}_{9,9'}$). IR (KBr) ($\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$): 3065, 2928 e 2853 (ν_{CH}), 1613 (ν_{CC}), 1495 e 1420 (ν_{CN}), 1258 (ν_{asCOC}), 1173 (δ_{CH}), 1030 (ν_{sCOC}), 843 (π_{CH}).

Composto 3b: Sólido marrom. Rendimento 3,5%. CHN: $\text{RuO}_2\text{N}_3\text{Cl}_2\text{C}_{20}\text{H}_{17}\cdot\text{H}_2\text{O}$ experimental (calculado): %C: 37.3 (46.0), %H: 2.7 (3.6), e %N: 7.2 (8.0). Pureza 99,12%. ^1H RMN: (200MHz, 30°C, CDCl_3 , TMS) δ ppm: 3.92 (3H, H_1), 5.72 (6H, H_{10}), 7.07 (2H, $\text{H}_{6,6'}$), 7.81 (2H, $\text{H}_{8,8'}$), 8.09 (2H, H_7 , τ'), 9.32 (2H, $\text{H}_{9,9'}$). IR (KBr) ($\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$): 3069 (ν_{CH}), 1613 (ν_{CC}), 1495 e 1422 (ν_{CN}), 1262 (ν_{asCOC}), 1179 (δ_{CH}), 1025 (ν_{sCOC}), 840 (π_{CH}).

3.2.2. Síntese dos compostos 2a, 2b, 4a, 4b (complexos catiônicos)

Em um balão de Schlenk de 100mL, foram adicionados 0,1g (0,2mmol) de precursor em 20mL de metanol. Em seguida o ligante de interesse, em quantidade estequiométrica $\text{L}:[\{(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}\}_2\text{Cl}_2]$ (2:1), foi dissolvido em 10mL de metanol e adicionado lentamente ao meio reacional. A solução foi agitada por 4 horas a temperatura ambiente e protegida da luz (com exceção da reação com o ligante **L4a**, que foi agitada por 18 horas à 45°C). Após isso, o volume da solução foi reduzido a aproximadamente 1mL e foi adicionado NH_4PF_6 em excesso, para precipitar o produto, que foi mantido sob refrigeração por 24 horas. Por fim o produto foi filtrado e lavado com éter e metanol e seco sob vácuo (Figura 3.3).⁵³ Foi necessária a purificação apenas do composto **2b**, que foi realizada através de sucessivas lavagens da amostra com isopropanol, eliminando o excesso de ligante.

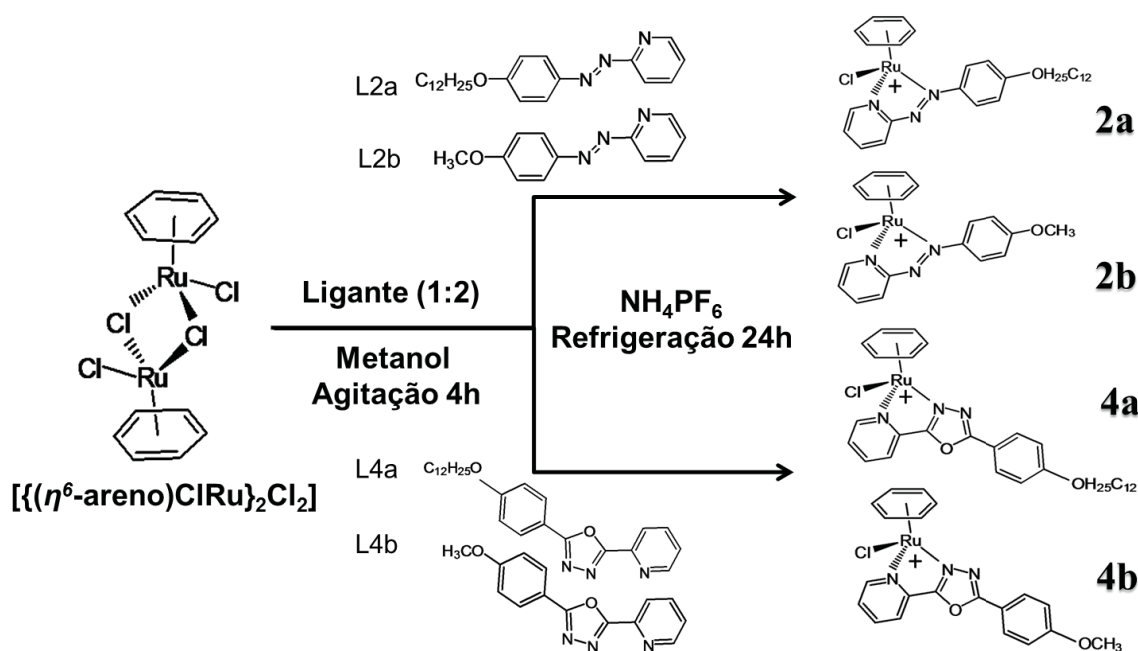


Figura 3.3. Esquema ilustrativo para a síntese dos compostos catiônicos **2a**, **2b**, **4a** e **4b**.

Composto 2a: Sólido marrom. Rendimento 79,2%. $\text{CHN RuON}_3\text{ClC}_{29}\text{H}_{39}\text{PF}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ experimental (calculado): %C: 45.5 (46.7), %H: 5.6 (5.5), e %N: 5.9 (5.6). Pureza 99.95%. ^1H RMN: (200MHz, 30°C, CDCl_3 , TMS) δ ppm: 0.89 (3H, H_1), 1.28 (16H, H_2), 1.48 (2H, H_3), 1.87 (2H, H_4), 4.14 (2H, H_5), 6.05 (6H, H_{10}), 7.09 (2H, $\text{H}_{6,6'}$), 7.73 (1H, H_9), 8.21 (2H, H_7 , τ'), 8.50 (d, 1H, H_8 e t, 1H, $\text{H}_{8'}$), 9.30 (1H, H_9'). IR (KBr) ($\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$): 3109, 2924 e 2851 (ν_{CH}), 1597 (ν_{CC}), 1499 e 1409 (ν_{CN}), 1260 (ν_{asCOC}), 1150 (δ_{CH}), 1020 (ν_{sCOC}), 838 (ν_{PF}) e 560 (π_{CC}). ESI/MS para $\text{M}^+[\text{RuON}_3\text{ClC}_{29}\text{H}_{39}]^+$: Calculado: 582,18g·mol $^{-1}$, encontrado: m/z 582.34.

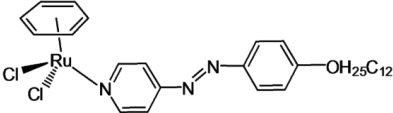
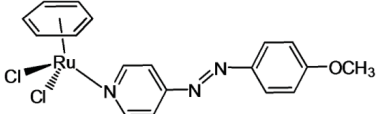
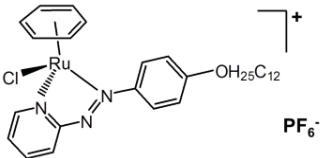
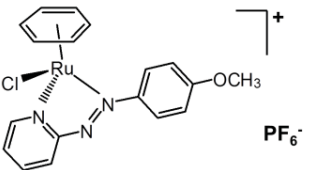
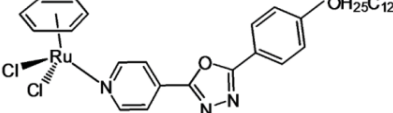
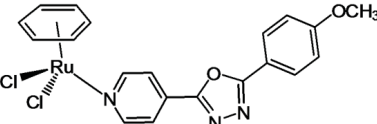
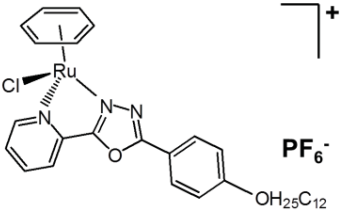
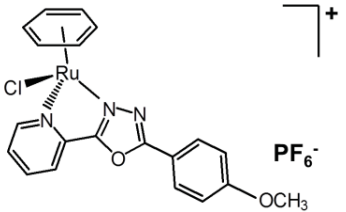
Composto 2b: Sólido marrom. Rendimento 24,6%. $\text{CHN RuON}_3\text{ClC}_{18}\text{H}_{17}\text{PF}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ experimental (calculado): %C: 37.0 (36.6), %H: 3.2 (3.2), e %N: 6.9 (7.1). Pureza 99.96%. ^1H RMN: (200MHz, 30°C, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, TMS) δ ppm: 3.98 (3H, H_1), 6.28 (6H, H_{10}), 7.27 (2H, $\text{H}_{6,6'}$), 7.92 (1H, H_9), 8.24(2H, H_7 , τ'), 8.45 (1H, $\text{H}_{8'}$), 8.78 (1H, H_8), 9.68(1H, H_9'). IR (KBr) ($\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$): 3094 (ν_{CH}), 1596 (ν_{CC}), 1466 e 1370 (ν_{CN}), 1262

(ν_{asCOC}), 1154 (δ_{CH}), 1027 (ν_{sCOC}), 832 (ν_{PF}) e 558 (π_{CC}). ESI/MS para $\text{M}^+[\text{RuON}_3\text{ClC}_{18}\text{H}_{17}]^+$: Calculado: 427,88 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, encontrado: m/z 428.09.

Composto 4a: Sólido verde. Rendimento 78,5%. CHN $\text{RuO}_2\text{N}_3\text{ClC}_{31}\text{H}_{39}\text{PF}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$ experimental (calculado): %C: 45.3 (47.4), %H: 5.0 (5.3), e %N: 5.8 (5.3). Pureza 99.87%. ^1H RMN: (200MHz, 30°C, CDCl_3 , TMS) δ_{ppm} : 0.89 (3H, H_1), 1.28 (16H, H_2), 1.48 (2H, H_3), 1,87 (2H, H_4), 4.07 (2H, H_5), 6.12 (6H, H_{10}), 7.06 (2H, $\text{H}_{6,6'}$), 7.72 (1H, H_9), 8.08 (4H, H_7 , 7',8,8'), 9.38 (1H, H_9). IR (KBr) ($\nu_{\text{maxcm}^{-1}}$): 3094, 2923 e 2853 (ν_{CH}), 1609 (ν_{CC}), 1499 e 1438 (ν_{CN}), 1262 (ν_{asCOC}), 1179 (δ_{CH}), 1025 (ν_{sCOC}), 838 (ν_{PF}). ESI/MS para $\text{M}^+[\text{RuO}_2\text{N}_3\text{ClC}_{31}\text{H}_{39}]^+$: Calculado: 622,20 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, encontrado: m/z 622.31.

Composto 4b: Sólido verde. Rendimento 77,3%. CHN $\text{RuO}_2\text{N}_3\text{ClC}_{20}\text{H}_{17}\text{PF}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$ experimental (calculado): %C: 37.2 (38.0), %H:3.1 (3.0), e %N:6.8 (6.6). Pureza 99.93%. ^1H RMN: (200MHz, 30°C, CDCl_3 , TMS) δ_{ppm} : 3.94 (3H, H_1), 6.15 (6H, H_{10}), 7.09 (2H, $\text{H}_{6,6'}$), 7.75 (1H, H_9), 8.11 (4H, H_7 , 7', 8,8'), 9.35 (1H, H_9). IR (KBr) ($\nu_{\text{maxcm}^{-1}}$): 3094 (ν_{CH}), 1609 (ν_{CC}), 1500 e 1420 (ν_{CN}), 1265 (ν_{asCOC}), 1181 (δ_{CH}), 1021 (ν_{sCOC}), 836 (ν_{PF}). ESI/MS para $\text{M}^+[\text{RuO}_2\text{N}_3\text{ClC}_{20}\text{H}_{17}]^+$: Calculado: 467,90 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, encontrado: m/z 468.16.

Tabela 3.1. Estruturas dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) anfífilos contendo ligantes fenilazo (grupo I) e feniloxadiazol (grupo II) estudados e suas respectivas massas molares

Compostos	Estrutura	Massa Molar (g·mol ⁻¹)
Grupo I		
1a		617,63
1b		463,33
2a		727,14
2b		572,84
Grupo II		
3a		657,65
3b		503,35
4a		767,16
4b		612,86

3.3. Técnicas de caracterização

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H foram registrados em um espectrômetro Bruker DPX operando a 200MHz. O solvente empregado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) contendo 0,1% de TMS (tetrametilsilano) como referência.

O analisador elementar 2400 CHN Perkin-Elmer Série II - EUA foi utilizado para caracterizar a composição das amostras.

Os espectros de massa (ESI-MS) foram obtidos em um espectrômetro Thermo Fisher Scientific Inc. LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer. A concentração aproximada das amostras foi de $10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em diclorometano. Utilizou-se o modo iônico positivo para registrar as amostras.

Espectros de infravermelho foram obtidos a partir dos materiais na forma de pó dispersos em pastilhas de KBr na região de 4000 a 400cm^{-1} por transmitância, em um espectrofotômetro FTIR, Bruker Vertex 70, com resolução de 4cm^{-1} .

Os espectros UV-vis foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV 2401 PC, na faixa de 190 a 1200nm, utilizando cubetas de quartzo com caminho ótico de 1cm, a partir de soluções em clorofórmio, DMSO e solução aquosa contendo 1% de DMSO. Os valores de ϵ foram calculados segundo a lei de Lambert-Beer, através de cinco a dez medidas consecutivas de absorbância em um determinado comprimento de onda, para soluções em diferentes concentrações. Os valores de absorbância foram plotados contra os valores de concentração correspondentes. A curva obtida foi ajustada para uma reta através de uma regressão linear e o valor de ϵ foi obtido como o coeficiente angular da reta ajustada.

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados num potenciostato/galvanostato Ivium Technologies, modelo Compact Stat. As medidas foram conduzidas utilizando célula de três eletrodos. O eletrodo de trabalho empregado foi de disco de platina com diâmetro de 3mm. Uma agulha de inox foi utilizada como contra-eletrodo e o eletrodo de referência de Ag/Ag^+ $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em CH_3CN . Foi utilizada como solução eletrolítica de perclorato de tetrabutilamônio (TBAClO_4) $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em diclorometano ou acetonitrila. Os voltamogramas foram obtidos a partir

de soluções aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em diclorometano ou acetonitrila, geralmente em cinco velocidades de varredura (5, 10, 20, 50 e $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$). Os valores de $E_{1/2}$ foram calculados segundo a relação $(E_{\text{pc}} + E_{\text{pa}})/2$. Todos os valores de potencial apresentados foram convertidos para valores vs EPH somando-se 0,4672 V (acetonitrila) e 0,4392 V (diclorometano). Esses valores foram determinados através do $E_{1/2}$ do par ferroceno/ferrocínio obtido experimentalmente nas células eletroquímicas.

Os experimentos de espectroeletroquímica UV-vis foram realizados empregando-se um potenciostato/galvanostato Ivium Technologies, modelo Compact Stat acoplado ao espectrofotômetro HP Agilent 8453 e uma célula eletroquímica ALS SEC-C de camada delgada. Antes de cada medida, o potencial referente à medida foi aplicado por pelo menos 30 segundos para garantir a condição de equilíbrio.

3.4. Estudos de estabilidade, cinéticos e de substituição de ligantes

O estudo de estabilidade foi realizado no espectrofotômetro HP Agilent 8453. Os espectros UV-Vis foram obtidos a partir de $16,8 \mu\text{M}$ dos compostos **2b** e **4b** em i) em PBS (tampão fosfato salino) contendo 1% de DMSO; ii) em DMSO; iii) em H_2O contendo 1% de DMSO e $0,017 \text{ mmol}$ de AgNO_3 ao longo de 72 horas.

O estudo cinético foi realizado no espectrofotômetro HP Agilent 8453, no modo cinético. As soluções dos compostos utilizados foram preparadas na concentração de $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a 1% de DMSO e H_2O . A medida cinética foi realizada à 37°C (temperatura corporal) durante 10800 segundos.

O estudo de substituição de ligantes foi realizado no espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H Bruker DPX operando a 200MHz. O solvente empregado foi Dimetilsulfoxido deuterado $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ contendo 0,1% de TMS (tetrametilsilano) como referência. Os espectros de RMN de ^1H foram registrados ao longo de 72h.

3.5. Soluções

Os compostos foram dissolvidos em DMSO para obter uma solução estoque de 20 ou 12,5mM e posteriormente diluídos em meio de cultura nas concentrações desejadas para cada experimento ($2,5 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). As soluções em DMSO foram estocadas à -20°C e descongeladas no momento do uso. Para cada experimento realizado foram também realizados ensaios controle com a mesma quantidade do solvente (0,1% de DMSO) diluído em meio de cultura, nas mesmas condições experimentais.

3.6. Ensaios em Modelos Biológicos

3.6.1. Linhagem celular

BHK21 e BHK21 MRP1 - São células aderentes de fibroblastos imortalizadas de mamíferos (*Baby Hamster Kidney 21*). A linhagem BHK21 foi utilizada como controle, a linhagem BHK21 transfectada com o gene que codifica para MRP1 (pcDNA3.1-ABCC1, induzindo a superexpressão da proteína MRP 1 e a linhagem BHK21-MRP1mutante, (pcDNA3.1-ABCC1mut) que codifica para a proteína MRP1 não funcional.

HEK293 e HEK293-ABCG2 - São células humanas embrionárias de rim (*Human Embryonic Kidney*). A linhagem HEK293 foi utilizada como controle e a linhagem HEK293 transfectada com o gene que codifica para ABCG2 (pcDNA3.1-ABCG2), induzindo a superexpressão da proteína ABCG2.

NIH3T3 e NIH3T3-Pgp - São células epiteliais murinas. A linhagem NIH3T3 foi utilizada como controle e a linhagem NIH3T3 transfectada com o gene que codifica P-gp (pcDNA5-ABCB1), induzindo a superexpressão da proteína Pgp.

U87MG, T98G e U251 – São células de glioblastoma humano, grau IV de malignidade.

3.6.2. Condições de cultivo das linhagens celulares

As diversas linhagens celulares utilizadas neste trabalho desenvolvem-se como culturas aderentes cultivadas à temperatura de 37°C e sob atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado foi DMEM alta glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% penicilina/estreptomicina, com exceção da linhagem BHK-21 e BHK-21 MRP1 que foi utilizado o meio de cultura DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich), suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina. O meio de cultura foi enriquecido com agente de seleção, variando de acordo com a linhagem celular: 0,1mg·mL⁻¹ de metotrexato para BHK21 MRP1, 0,75mg·mL⁻¹ de Geneticina para HEK293-ABCG2 e 60ng·mL⁻¹ de colchicina para NIH3T3-Pgp. Para o armazenamento das linhagens 10⁷ células·mL⁻¹ foram ressuspensas em meio de cultura suplementado com 10% SFB e 5% de DMSO e armazenadas em freezer a -80°C.

3.7. Ensaio de citotoxicidade celular : MTT

O objetivo desta técnica é avaliar a citotoxicidade celular. Uma solução de brometo de 3,4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT) (5mg·mL⁻¹) é adicionado em excesso sobre as células. Em células viáveis, este reagente de cor amarelo é reduzido por desidrogenases celulares para a forma de cristais de formazan de cor purpura (Figura 3.4). Após dissolução, a absorvância correspondente ao formazan (λ =570nm) é medida, utilizando um espectrofotômetro. Considerando que células cultivadas na condição controle (com adição do veículo - solvente) correspondem a 100% de viabilidade, é possível avaliar a percentagem de células metabolicamente ativas.

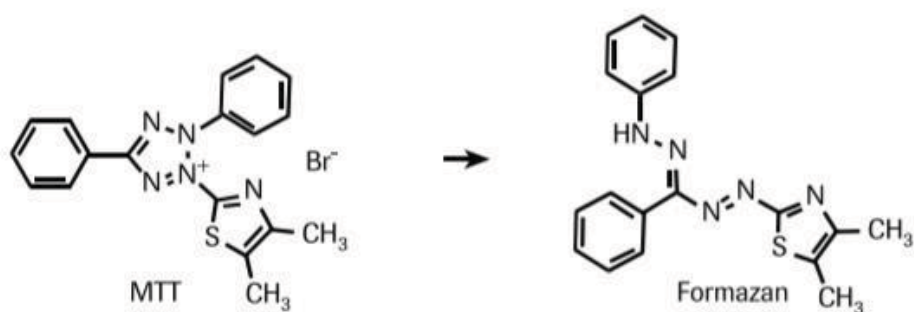


Figura 3.4. Redução de MTT em Formazan em células vivas pela ação de redutases celulares.¹¹⁸

As células foram plaqueadas e após adesão (24 horas, 37°C e 5% de CO₂) foi adicionado meio de cultura com os compostos de η^6 -arenorutênio(II) diluídos para obter as concentrações finais de 0-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e o controle com 0,1% de DMSO. As células foram incubadas por 72 horas. Depois de transcorrido o tempo de cada um dos tratamentos adiciona-se uma solução de brometo de 3,4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT) (5mg·mL⁻¹). Após 3 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante é retirado por inversão e as células são ressuspensas em 200 μL de DMSO. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (TECAN Infinite 200) utilizando filtro de 545nm. Os resultados foram calculados a partir dos valores médios da absorbância das triplicatas experimentais e expressos em porcentagem do cristal de formazan formado em relação ao controle (considerado como 100%).

3.8. Ensaio de inibição das proteínas transportadoras da família ABC por Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite o estudo preciso de células isoladas entrando em um fluxo líquido. As células, alinhadas uma atrás das outras e separadas por 1mm de intervalo, passam pelo fluxo a uma velocidade cerca de 10m·s⁻¹

¹, sendo detectadas por um laser (com comprimento de onda específico) e a luz reemitida pelas células são detectadas pelo aparelho e a amostra pode ser analisada de acordo com os seguintes critérios (Figura 3.5):

- Parâmetro FSC (**Foward Scatter**): mede o tamanho relativo das células. Corresponde à luz difratada através das células, medida em pequenos ângulos do eixo do feixe incidente.
- Parâmetro SSC (**Side Scatter**): granulosidade ou complexidade da célula. Corresponde a uma mistura de difusão, reflexão e refração, coletado em 90° para o feixe incidente.
- Parâmetro FL: intensidade de fluorescência.

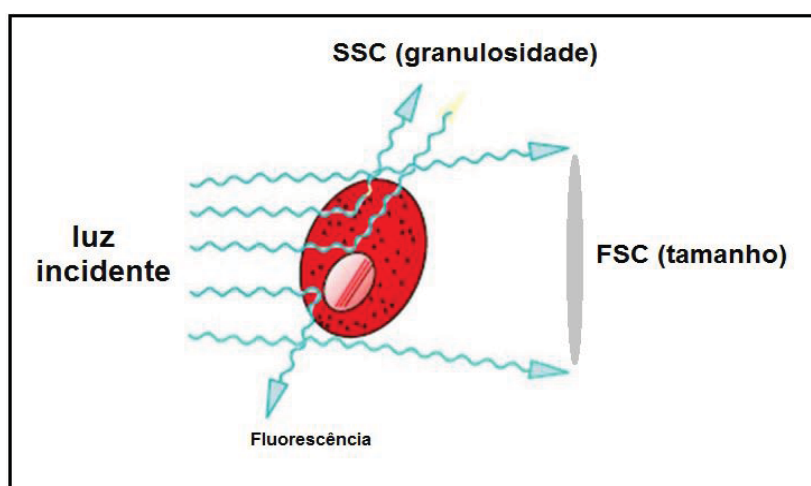


Figura 3.5. Parâmetros medidos pela citometria de fluxo.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, de forma a atingir 80% de confluência (nas concentrações de 1×10^5 células/poço para BHK-21 MRP1; 1×10^5 células/poço para HEK293-ABCG2 e 6×10^4 células/poço para NIH 3T3-Pgp). Após 48 horas, as células foram tratadas com os substratos por 30 minutos a 37°C. Cada placa contém:

- **Controle negativo:** Células incubadas em 200µL de meio contendo 0,5% de DMSO;

- **Controle positivo:** Células incubadas em 200µL de meio contendo os substratos calceína à 0,2µmol·L⁻¹ (BHK-21 MRP1 e NIH3T3-Pgp) ou mitoxantrona à 5µmol·L⁻¹ (HEK293-ABCG2);
- **Referência :** Células incubadas em 200µL de meio contendo calceína à 0,2µmol·L⁻¹ e o inibidor verapamil à 35µmol·L⁻¹ (BHK-21 MRP1) ou o inibidor GF120918 à 5µmol·L⁻¹ (NIH3T3-Pgp) e mitoxantrona à 5µmol·L⁻¹ e o inibidor Ko143 à 1µM (HEK293-ABCG2);
- **Amostras :** Células incubadas em 200µL de meio contando os substratos calceína à 0,2µmol·L⁻¹ (BHK-21 MRP1 e NIH3T3-Pgp) ou mitoxantrona à 5µmol·L⁻¹ (HEK293-ABCG2) e os compostos de η^6 -arenorutênio(II) a serem testados.

Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, coletadas, ressuspensas em 200µL de PBS e mantidas em gelo até análise por citometria de fluxo no equipamento FACS Calibur (Becton Dickinson- Plataforma técnica Anira-UMS3444, Lyon-França). Foram coletados 10000 células viáveis de cada amostra, sendo que o controle de 100% de inibição foi obtido pela fluorescência das células incubadas com os inibidores de referência (verapamil à 35µmol·L⁻¹ BHK21-MRP1; GF120918 à 5µmol·L⁻¹ NIH3T3-Pgp e o inibidor Ko143 à 1µM HEK293-ABCG2).

3.9. Análise de ciclo celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular foi avaliada através da análise da porcentagem de células nas fases G1/G0, S e G2/M utilizando iodeto de propídio. As células T98G (6×10⁴ células/poço) foram incubadas em placas de 12 poços (24 horas, 37°C). As células foram então tratadas com 25 e 100µmol·L⁻¹ de compostos η^6 -arenerutênio (II) durante 72 horas e o controle com 0,1% de DMSO em meio de cultura. Após centrifugação, o sedimento de células foi lavado duas vezes com PBS e incubado com uma solução a frio de iodeto de propídio a 50µg·mL⁻¹, 0,1% de Triton X-100, 0,1% de

citrato de sódio e $0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de RNase A (30 minutos, no escuro). As amostras foram colhidas num citômetro Accuri, e os histogramas obtidos foram analisados para determinar a proporção de células nas fases do ciclo celular, utilizando o software BD Accuri C6.

A fragmentação do DNA foi avaliada através da análise da porcentagem de células em SubG1 utilizando iodeto de propídio.¹¹⁹ As células da linhagem T98G (6×10^4 células/poço) foram incubadas em placas de 12 poços (24 horas, 37°C). As células foram então tratadas com 25 e $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de compostos η^6 -arenerutênio (II) durante 72 horas e o controle com 0,1% de DMSO em meio de cultura. Após centrifugação, o sedimento de células foi lavado duas vezes com PBS e incubado com uma solução a frio de iodeto de propídio a $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e $0,2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de RNase A (30 minutos, no escuro). As amostras foram colhidas num citômetro Accuri e os histogramas de DNA obtidos foram analisados para medir a proporção de células hipodiplóides sub-G1, utilizando o software BD Accuri C6.

4. Análise estatística

Os resultados de média \pm DP foram submetidos à análise de variância (oneway ANOVA) e teste Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05$.

Capítulo 4:

Síntese e Caracterização dos compostos η^6 - arenorutênio(II)

Capítulo 4 . Síntese e caracterização dos compostos η^6 -arenorutênio(II)

4.1. Sínteses dos compostos η^6 -arenorutênio(II)

As sínteses dos dois grupos de compostos η^6 -arenorutênio(II) foram realizadas com sucesso, adaptando procedimentos já descritos.^{37, 53} Os compostos η^6 -arenorutênio(II) neutros **1a**, **1b**, **3a** e **3b**, apresentaram baixa solubilidade em vários solventes e adsorção irreversível na sílica, o que impossibilitou a purificação por coluna cromatográfica. No entanto, a purificação foi realizada através de várias lavagens das amostras com THF e diclorometano, que removeu o excesso de ligante e de precursor. Os resultados de CHN (item 3.2.1) comprovaram a pureza das amostras.

Os compostos η^6 -arenorutênio(II) catiônicos, **2a**, **2b**, **4a** e **4b**, apresentaram alta solubilidade em diversos solventes como, diclorometano, clorofórmio e acetonitrila. A rota sintética adotada para esse grupo de compostos foi bastante eficiente, uma vez que, apenas o composto **2b** necessitou ser purificado. A purificação foi realizada por sucessivas lavagens da amostra com isopropanol, eliminando o excesso de ligante. Os resultados de CHN (item 3.2.2) comprovaram a pureza das amostras.

Para visualização de picos no ESI-MS, nos compostos η^6 -arenorutênio(II) neutros **1a**, **1b**, **3a** e **3b**, em cada experimento foi adicionado ácido acético para protonar as espécies e formar cátions. Porém, nos espectros de massa não foram observados picos condizentes com espécies MH^+ esperadas, mas foram observados picos atribuídos a fragmentos. Isso será discutido na seção 4.3. Entretanto, os resultados de 1H -RMN, FTIR e UV-vis indicam que os compostos η^6 -arenorutênio(II) coordenados aos ligantes fenilazo e feniloxadiazo foram alcançados. A caracterização estrutural e eletrônica dos compostos será discutida a seguir.

4.2. Ressonância magnética nuclear de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H apresentados nas figuras 4.1 a 4.8 são condizentes com as estruturas dos respectivos compostos de partida. As atribuições dos sinais de ^1H foram feitas comparando os sinais experimentais com valores de deslocamento químico de complexos similares descritos na literatura e dos valores experimentais dos ligantes livres.

Nos espectros de ^1H RMN obtidos em CDCl_3 e em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, os desvios químicos não mostram alterações significativas para os complexos em comparação com os ligantes livres, exceto para os sinais atribuídos aos H_α e H_β do resíduo da piridina do ligante anfifílico. A Tabela 4.1 mostra os valores dos desvios químicos para H_α e H_β para os complexos e os ligantes livres (uma descrição completa para todos os valores δ e $\Delta\delta$ são mostradas nas tabelas 4.2 a 4.9).

Para os compostos de η^6 -arenorutênio (II), os sinais do H_α foram atribuídos ao duplete a $\delta = 9,3$ ppm, o qual é deslocado 0,4-0,6 ppm em comparação com os ligantes livres. Os compostos neutros **1a**, **1b**, **3a** e **3b** exibem o sinal de H_α correspondente a dois hidrogênios equivalentes, enquanto os compostos catiônicos **2a**, **2b**, **4a** e **4b** exibem este sinal correspondente a um hidrogênio. O H_β para o grupo I apareceu como um duplete a $\delta = 7,67$ e $7,68$ ppm para **1a** e **1b**, respectivamente, e a $\delta = 7,73$ e $7,92$ ppm para **2a** e **2b**, respectivamente. O H_β para o grupo II apareceu como um duplete a $\delta = 7,99$ e $7,81$ ppm para **3a** e **3b** e a $\delta = 7,72$ e $7,75$ ppm para **4a** e **4b**, respectivamente. Os compostos neutros exibem o H_β deslocado 0,01-0,1 ppm em comparação com os ligantes livres, enquanto os catiônicos exibem esse deslocamento de 0,3-0,5 ppm.

O sinal de hidrogênio do benzeno foi atribuído ao singlete correspondente a seis hidrogênios a $\delta = 5,7$ e $6,0$ - $6,3$ ppm para complexos neutros e catiônicos, respectivamente. O benzeno livre exibe a ressonância a $\delta = 7,38$ ppm e o precursor $\text{Ar}_2\text{Ru}_2\text{Cl}_4$ a $\delta = 5,95$ ppm. Os valores do desvio químico sofrem influência da corrente do anel aromático, do rutênio (II) ligado ao N-piridínico, e do vizinho ligante clorido

através da ligação do rutênio e através do efeito espacial^{120 121, 122}; o último exibe uma relação direta com os desvios químicos do H $_{\alpha}$ da piridina e do H do benzeno, uma vez que as ressonâncias aparecem mais deslocadas nos compostos que possuem dois ligantes clorido em comparação com os que possuem apenas um ligante clorido. No entanto, o H $_{\beta}$ é mais sensível aos arredores do centro de rutênio (II) e aos resíduos azo ou oxadiazó, nos quais a ressonância varia nos compostos de $\delta = 7,67$ a $\delta = 7,99$ ppm, dependendo do resíduo aromático próximo. Estes resultados evidenciam a coordenação mono- ou bidentada do ligante anfifílico aos compostos. Esses deslocamentos dos hidrogênios do anel benzênico está de acordo com o retratado na literatura por Dougan *et al.*⁵³, que descreveram uma série de complexos derivados de η^6 -arenorutênio(II) com ligantes quelantes azo, com o sinal dos hidrogênios do anel benzênico em $\delta = 6,43$ ($[(\eta^6\text{-bz})\text{Ru}(\text{azpy})\text{Cl}]\text{PF}_6$), $\delta = 6,35$ ($[(\eta^6\text{-bz})\text{Ru}(\text{azpy-NMe}_2)\text{Cl}]\text{PF}_6$), $\delta = 6,29$ ($[(\eta^6\text{-bz})\text{Ru}(\text{azpy-OH})\text{Cl}]\text{PF}_6$) e $\delta = 6,29$ ($[(\eta^6\text{-bz})\text{Ru}(\text{azpyz-NMe}_2)\text{Cl}]\text{PF}_6$), onde bz = benzeno, azpy = 2-(fenilazopiridina), azpy-NMe $_2$ = 4-(2-piridilazo)-N,N-dimetilanilina, azpy-OH = 4-(2-piridilazo)fenol e azpyz-NMe $_2$ = 4-(1H-pirazol-3-azo)-N,N-dimetilanilina. Palepu *et al.*¹²³ relatam alguns compostos de η^6 -arenorutênio(II) com o sinal dos hidrogênios do anel benzênico em $\delta = 6,01$ ($[(\eta^6\text{-bz})\text{RuL1Cl}]\text{PF}_6$), $\delta = 6,13$ ($[(\eta^6\text{-bz})\text{RuL2Cl}]\text{PF}_6$) e $\delta = 6,03$ ($[(\eta^6\text{-bz})\text{RuL3Cl}]\text{PF}_6$), onde bz = benzeno, L1= aldoxima, L2= cetoxima e L3= amidoxima.

Tabela 4.1. Dados obtidos por RMN de ^1H para os compostos η^6 -arenorutênio (II) e ligantes livres em CDCl_3 e $^*(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Compostos	δ (ppm) H $_{\alpha}$ py	δ (ppm) H $_{\beta}$ py	Ligantes livres	δ (ppm) H $_{\alpha}$ py	δ (ppm) H $_{\beta}$ py
1a	9.21	7.67	L1a	8.78	7.72
1b	9.22	7.68	L1b	8.78	7.67
2a	9.30	7.73	L2a	8.71	7.36
2b*	9.68	7.92	L2b	8.70	7.37
3a	9.32	7.99	L3a	8.82	7.97
3b	9.32	7.81	L3b	8.83	7.97
4a	9.38	7.72	L4a	8.80	7.45

4b	9.35	7.75	L4b	8.81	7.47
----	------	------	-----	------	------

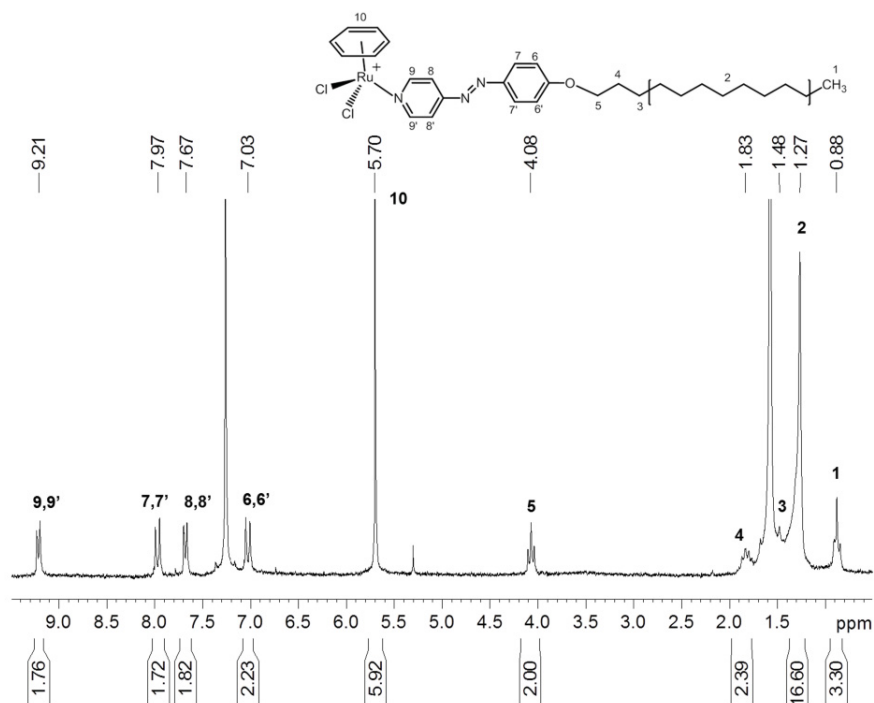


Figura 4.1. Espectro de RMN de ^1H do composto **1a** em CDCl_3 .

Tabela 4.2. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre **L1a** e do composto **1a**.

L1a		1a		
δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	Δ
0.87	(3H) H_1	0.88	(3H) H_1	0.01
1.20-1.40	(16H) H_2	1.27	(16H) H_2	0.07
1.47	(2H) H_3	1.48	(2H) H_3	0.01
1.82	(2H) H_4	1.83	(2H) H_4	0.01
4.05	(2H) H_5	4.08	(2H) H_5	0.03
-	-	5.70	(6H) H_{10}	-
7.02	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	7.03	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	0.01
7.72	(2H) $\text{H}_{8,8'}$	7.67	(2H) $\text{H}_{8,8'}$	0.05

7.96	(2H) H _{7, 7'}	7.97	(2H) H _{7, 7'}	0.01
8.78	(2H) H _{9,9'}	9.21	(2H) H _{9,9'}	0.43

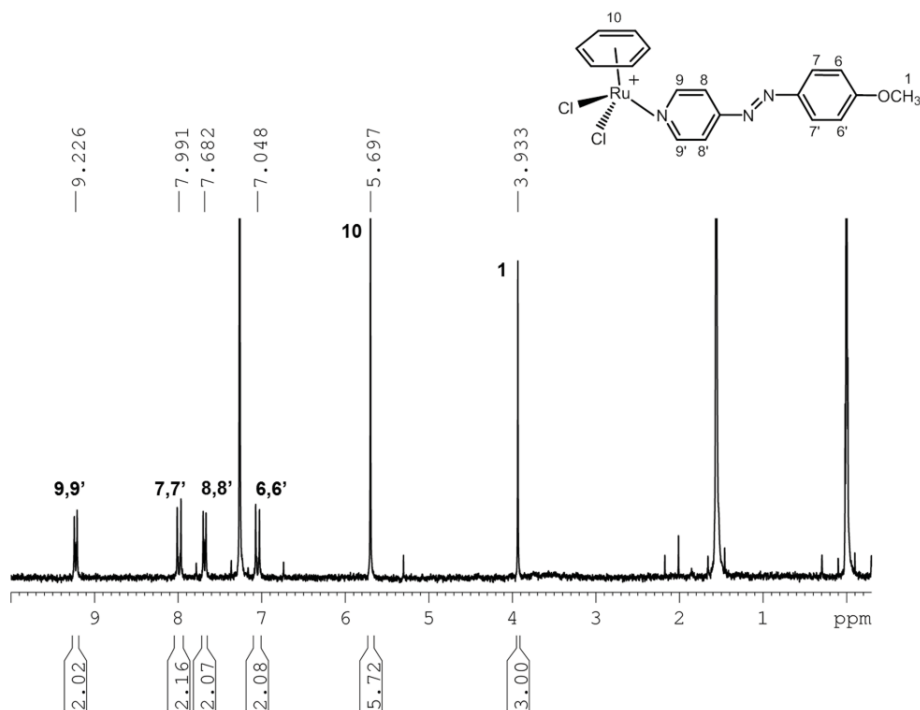


Figura 4.2. Espectro de RMN de ^1H do composto **1b** em CDCl_3 .

Tabela 4.3. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre **L1b** e do composto **1b**.

L1b		1b		
δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	Δ
3.91	(3H) H ₁	3.93	(3H) H ₁	0.02
-	-	5.69	(6H) H ₁₀	-
7.03	(2H) H _{6,6'}	7.04	(2H) H _{6,6'}	0.01
7.67	(2H) H _{8,8'}	7.68	(2H) H _{8,8'}	0.01
7.97	(2H) H _{7, 7'}	7.99	(2H) H _{7, 7'}	0.02
7.8 ⁸	(2H) H _{9,9'}	9.22	(2H) H _{9,9'}	0.44

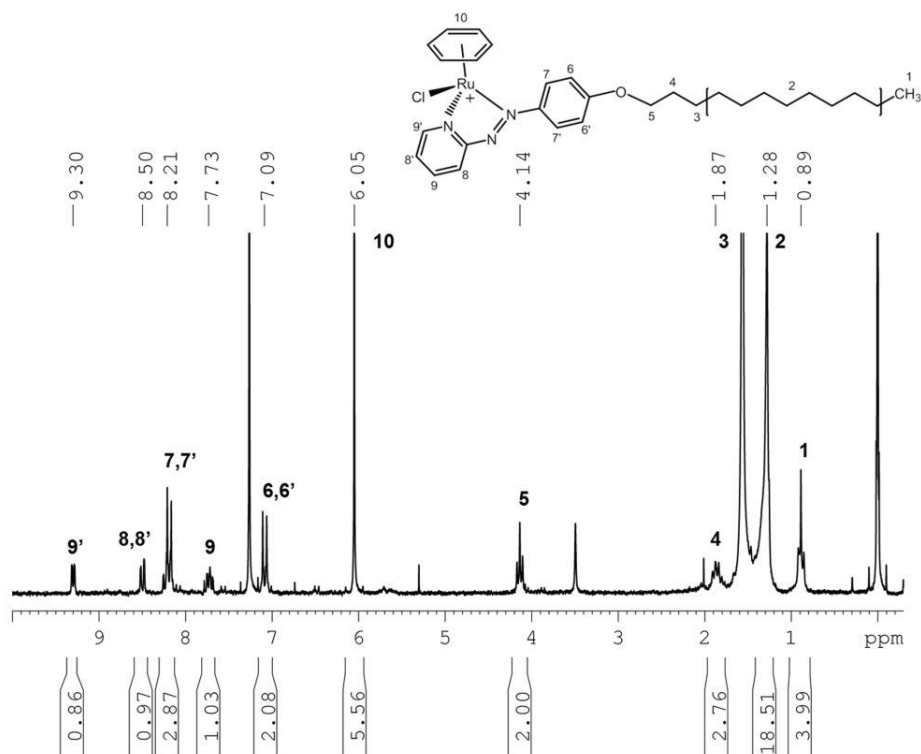


Figura 4.3. Espectro de RMN de ^1H do composto **2a** em CDCl_3 .

Tabela 4.4. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre **L2a** e do composto **2a**.

L2a		2a		Δ
δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	
0.88	(3H) H_1	0.89	(3H) H_1	0.01
1.21-1.41	(16H) H_2	1.28	(16H) H_2	0.07
1.47	(2H) H_3	1.48	(2H) H_3	0.01
1.82	(2H) H_4	1.87	(2H) H_4	0.05
4.05	(2H) H_5	4.14	(2H) H_5	0.09
-	-	6.05	(6H) H_{10}	-
7.01	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	7.09	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	0.08
7.36	(1H) H_9	7.73	(1H) H_9	0.37
7.79	(1H) H_8	-	-	-
7.87	(1H) $\text{H}_{8'}$	8.50	(2H) $\text{H}_{8,8'}$	0.63
8.05	(2H) $\text{H}_{7,7'}$	8.21	(2H) $\text{H}_{7,7'}$	0.16
8.71	(1H) $\text{H}_{9'}$	9.30	(1H) $\text{H}_{9'}$	0.59

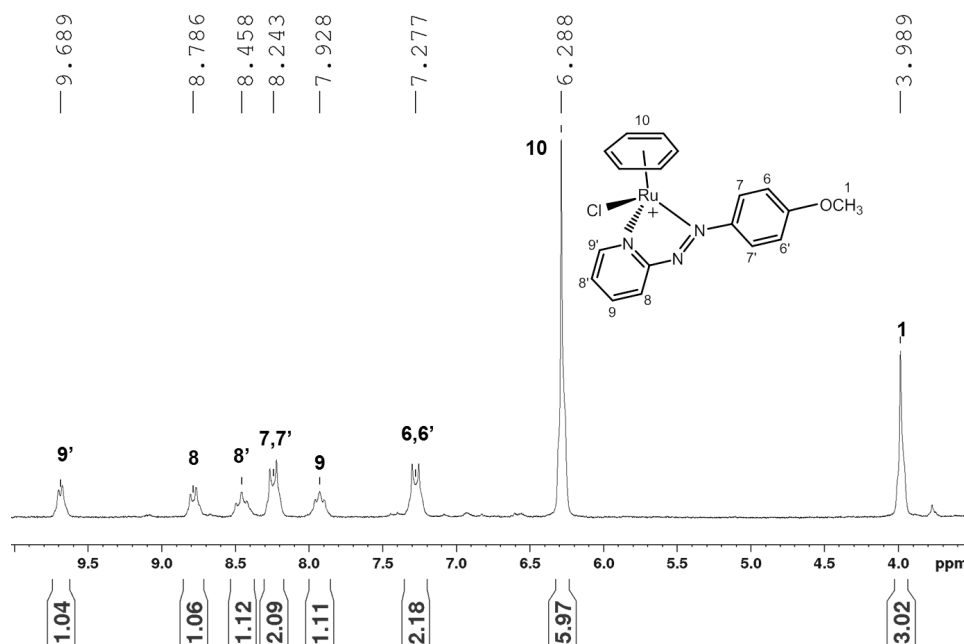


Figura 4.4. Espectro de RMN de ^1H do composto **2b** em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Tabela 4.5. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre **L2b** e do composto **2b**.

L2b		2b		
δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	Δ (2b)
3.91	(3H) H_1	3.98	(3H) H_1	0.07
-	-	6.28	(6H) H_{10}	-
7.03	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	7.27	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	0.24
7.37	(1H) H_9	7.92	(1H) H_9	0.55
7.76	(1H) H_8	8.78	(1H) H_8	1.02
7.94	(1H) $\text{H}_{8'}$	8.45	(1H) $\text{H}_{8'}$	0.51
8.07	(2H) $\text{H}_{7,7'}$	8.24	(2H) $\text{H}_{7,7'}$	0.17
8.70	(1H) $\text{H}_{9'}$	9.68	(1H) $\text{H}_{9'}$	0.98



Tabela 4.6. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre **L3a** e do composto **3a**.

75

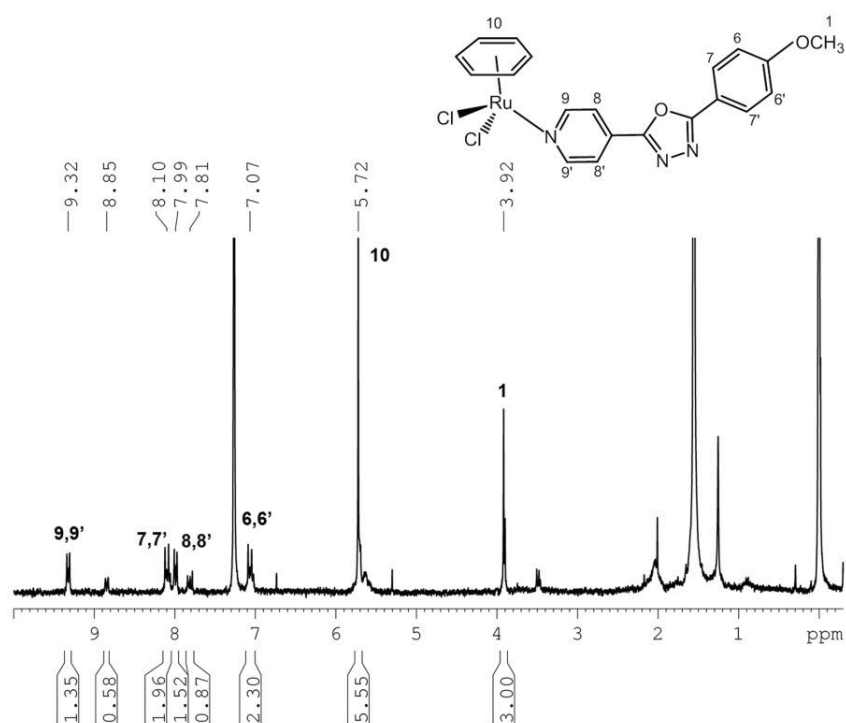


Figura 4.6. Espectro de RMN de ^1H do composto **3b** em CDCl_3 .

Tabela 4.7. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre **L3b** e do composto **3b**.

L3b		3b		Δ
δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	
3.90	(3H) H_1	3.92	(3H) H_1	0.02
-	-	5.72	(6H) H_{10}	-
7.04	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	7.07	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	0.03
7.97	(2H) $\text{H}_{8,8'}$	7.81	(2H) $\text{H}_{8,8'}$	0.04
8.09	(2H) $\text{H}_{7,7'}$	8.09	(2H) $\text{H}_{7,7'}$	0.00
8.83	(2H) $\text{H}_{9,9'}$	9.32	(2H) $\text{H}_{9,9'}$	0.49

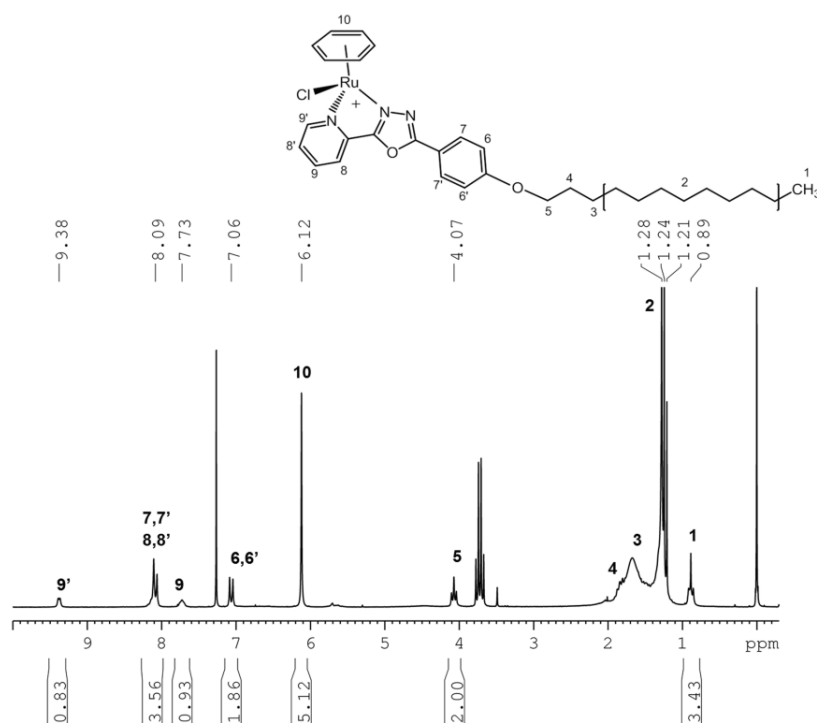


Figura 4.7. Espectro de RMN de ^1H do composto **4a** em CDCl_3 .

Tabela 4.8. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre **L4a** e do composto **4a**.

L4a		4a		
δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	Δ
0.87	(3H) H_1	0.89	(3H) H_1	0.02
1.17-1.38	(16H) H_2	1.28	(16H) H_2	0.11
1.46	(2H) H_3	1.48	(2H) H_3	0.02
1.80	(2H) H_4	1.87	(2H) H_4	0.07
4.02	(2H) H_5	4.07	(2H) H_5	0.05
-	-	6.12	(6H) H_{10}	-
7.00	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	7.06	(2H) $\text{H}_{6,6'}$	0.06
7.45	(1H) H_9	7.72	(1H) H_9	0.27
7.88	(1H) H_8	-	-	-
8.13	(2H) $\text{H}_{7,7'}$	8.08	(4H) $\text{H}_{7,7',8,8'}$	0.20
8.29	(1H) $\text{H}_{8'}$	-	-	-

8.80	(1H) H _{9'}	9.38	(1H) H _{9'}	0.58
------	----------------------	------	----------------------	------

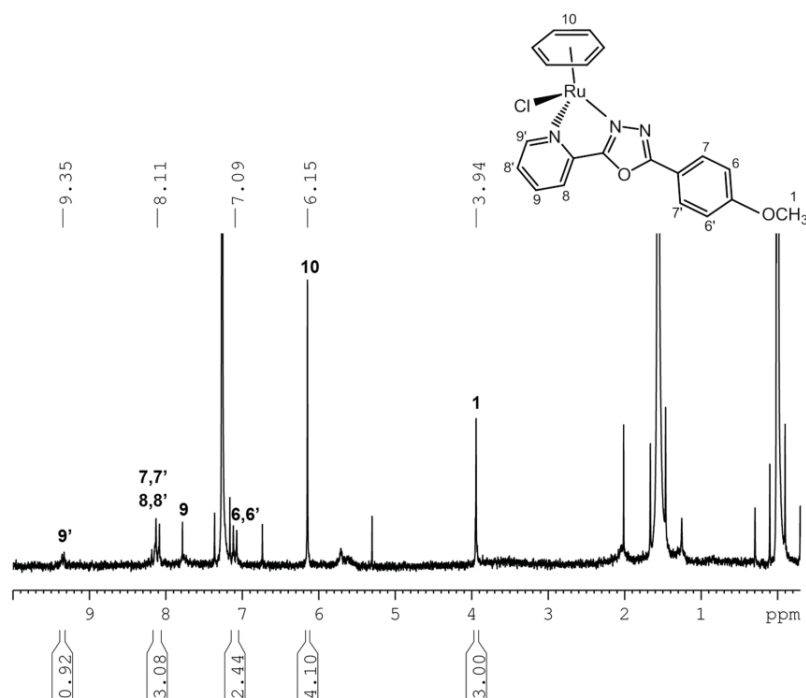


Figura 4.8. Espectro de RMN de ^1H do composto **4b** em CDCl_3 .

Tabela 4.9. Deslocamento químico δ (ppm) de ^1H do ligante livre **L4b** e do composto **4b**.

L4b		4b		Δ
δ (ppm)	H	δ (ppm)	H	
3.89	(3H) H ₁	3.94	(3H) H ₁	0.05
-	-	6.15	(6H) H ₁₀	-
7.03	(2H) H _{6,6'}	7.09	(2H) H _{6,6'}	0.06
7.47	(1H) H ₉	7.75	(1H) H ₉	0.28
7.90	(1H) H ₈	-	-	-
8.16	(2H) H _{7,7'}	8.11	(4H) H _{7,7',8,8'}	0.21
8.30	(1H) H _{8'}	-	-	-
8.81	(1H) H _{9'}	9.35	(1H) H _{9'}	0.54

4.3. Espectrometria de massa (ESI-MS)

Os espectros de massa ESI registrados no modo iônico positivo, para os compostos catiônicos (**2a**, **2b**, **4a** e **4b**), apresentaram pico do íon molecular com distribuição isotópica característica para o rutênio. Já para os compostos neutros (**1a**, **1b**, **3a** e **3b**) foram observados picos mais intensos atribuídos aos ligantes livres.

O espectro de massa ESI do composto catiônico **2a** apresentou o pico centrado em m/z 582.34 ($MM = 582,18 \text{ g.mol}^{-1}$), atribuído a presença do íon molecular, a espécie $[\text{RuON}_3\text{ClC}_{29}\text{H}_{39}]^+$ ($[\mathbf{2a}\text{-PF}_6]^+$) (Figura 4.9) e o outro pico em m/z 546.41 atribuído à espécie sem o ligante clorido, $[\text{RuON}_3\text{C}_{29}\text{H}_{39}]^{2+}$. O espectro do composto **2b**, o pico do íon molecular $[\text{RuON}_3\text{ClC}_{18}\text{H}_{17}]^+$ ($[\mathbf{2b}\text{-PF}_6]^+$) foi observado como sendo o pico de maior intensidade centrado em m/z 428.09 ($MM = 427,88 \text{ g.mol}^{-1}$) (Figura 4.10). O espectro do composto **4a** mostrou a presença predominante de um pico centrado em m/z 622.31 ($MM = 622,20 \text{ g.mol}^{-1}$) atribuído a espécie $[\text{RuO}_2\text{N}_3\text{ClC}_{31}\text{H}_{39}]^+$ ($[\mathbf{4a}\text{-PF}_6]^+$) (Figura 4.11). O espectro do composto **4b** o pico em m/z 468.16 ($MM = 467,90 \text{ g.mol}^{-1}$) atribuído a espécie $[\text{RuO}_2\text{N}_3\text{ClC}_{20}\text{H}_{17}]^+$ ($[\mathbf{4b}\text{-PF}_6]^+$) e o pico em m/z 432.17 atribuído a espécie sem o ligante clorido, $[\text{RuO}_2\text{N}_3\text{C}_{20}\text{H}_{17}]^{2+}$ (Figura 4.12), todos com distribuição isotópica característica do rutênio.

Os espectros de massa ESI dos compostos neutros não apresentaram os picos na região esperada para os íons moleculares dos complexos **1a**, **1b**, **3a** e **3b**. Mas, foi observado no espectro de massa ESI do composto **1a**, um pico de maior intensidade em m/z 368,34, atribuído à espécie $\text{MH}^+ = 4\text{-(4'-dodeciloxifenilazo)piridina}$ (**L1a**) (Figura 4.13) e um pico em m/z 606.22 com distribuição isotópica típica de rutênio, que pode ser melhor observado com sua expansão na Figura 4.14. De acordo com o gráfico simulado considerando apenas a distribuição isotópica do rutênio na molécula esperada **1a** (Figura 4.14, inserção), a distribuição de picos está coerente com a presença de apenas um átomo de rutênio numa espécie monocatiônica. Essa nova espécie foi atribuída a um fragmento gerado pela protonação, que levou a uma reação de substituição no estado gasoso, dos ligantes cloridos pelo íon acetato. O pico em m/z 606.22 foi atribuído a espécie $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\mathbf{L1a})(\text{CH}_3\text{COO})]^+$.

Para o composto **1b**, um pico mais intenso observado em m/z 214,07 foi atribuído à espécie $MH^+ = 4$ -(4'-metoxifenilazo)piridina (**L1b**) (Figura 4.15) e um pico do íon molecular em m/z 453,10 atribuído à espécie $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{L1b})(\text{CH}_3\text{COO})]^+$ (Figura 4.15). Observou para o composto **3a** um pico mais intenso m/z 408,37, atribuído à espécie $MH^+ = 4$ -{(4-dodeciloifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina (**L3a**) e um pico do íon molecular em m/z 646,19 atribuído à espécie $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{L3a})(\text{CH}_3\text{COO})]^+$ (Figura 4.16). Para o composto **3b**, foi observado um pico em m/z 254,03, atribuído à espécie $MH^+ = 4$ -{(4-metoxioifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina (**L3b**) (Figura 4.17).

A presença dos ligantes livres deve-se, provavelmente, à decomposição do complexo pela protonação do ligante, que também levou a substituição no estado gasoso dos ligantes cloridos pelo íon acetato.

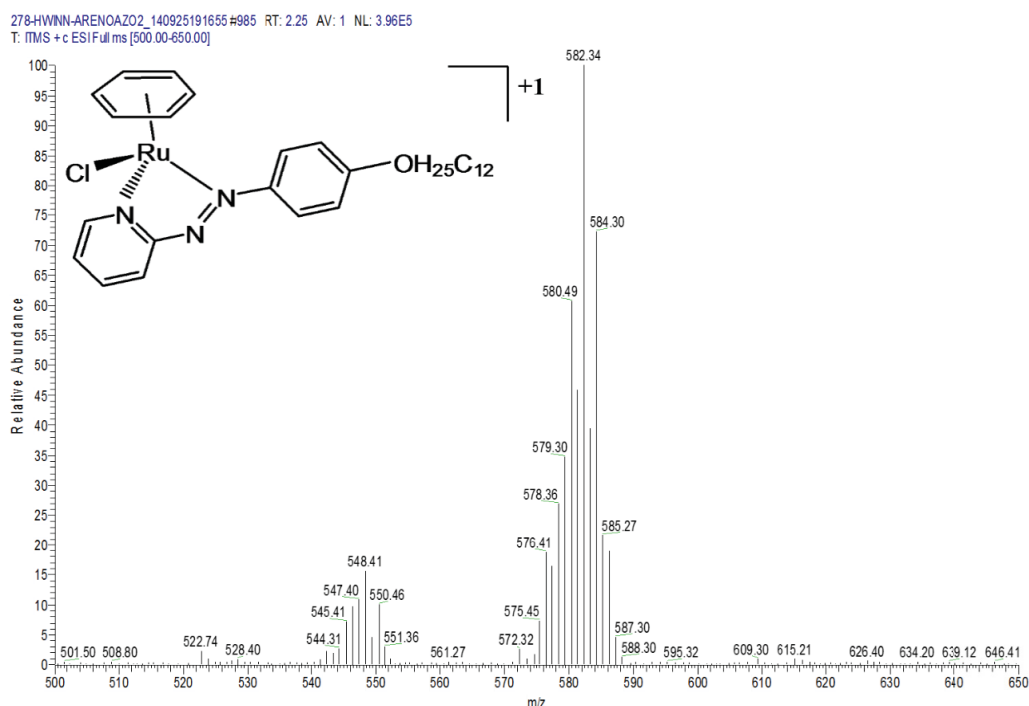


Figura 4.9. Espectro de ESI-MS do composto **2a**. Observa-se o pico mais intenso referente ao íon molecular, à espécie $[\text{RuON}_3\text{ClC}_{29}\text{H}_{39}]^+$ (**[2a-PF₆]**)⁺ e o pico em m/z 548.41 referente a espécie $[\text{RuON}_3\text{C}_{29}\text{H}_{39}]^{2+}$.

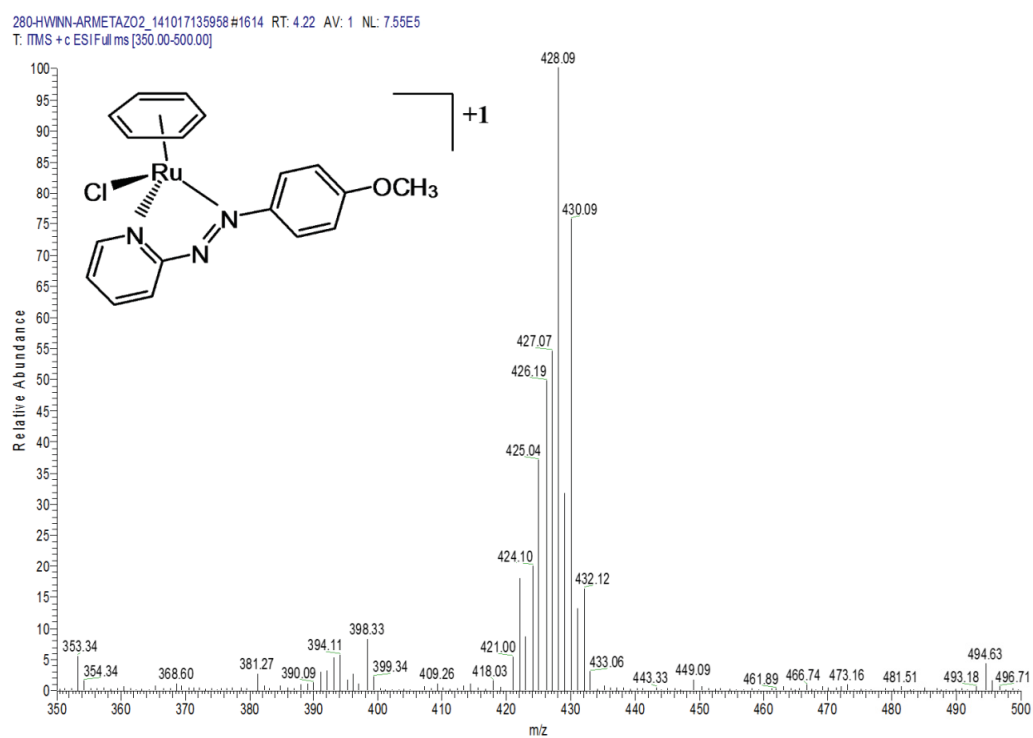


Figura 4.10. Espectro de ESI-MS do composto **2b**. Observa-se o pico mais intenso referente ao íon molecular, à espécie $[\text{RuON}_3\text{ClC}_{18}\text{H}_{17}]^+$ (**2b**- PF_6) $^+$.

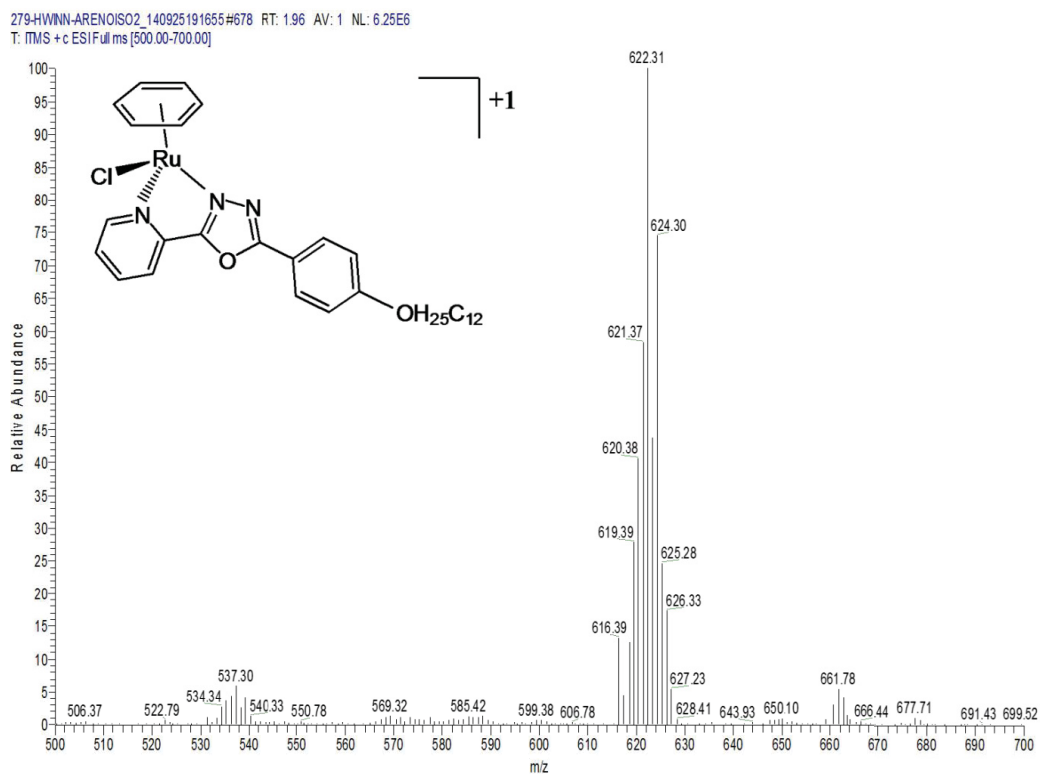


Figura 4.11. Espectro de ESI-MS do composto **4a**. Observa-se o pico mais intenso referente ao íon molecular, à espécie $[\text{RuO}_2\text{N}_3\text{ClC}_{31}\text{H}_{39}]^+$ (**4a**-PF₆)⁺.

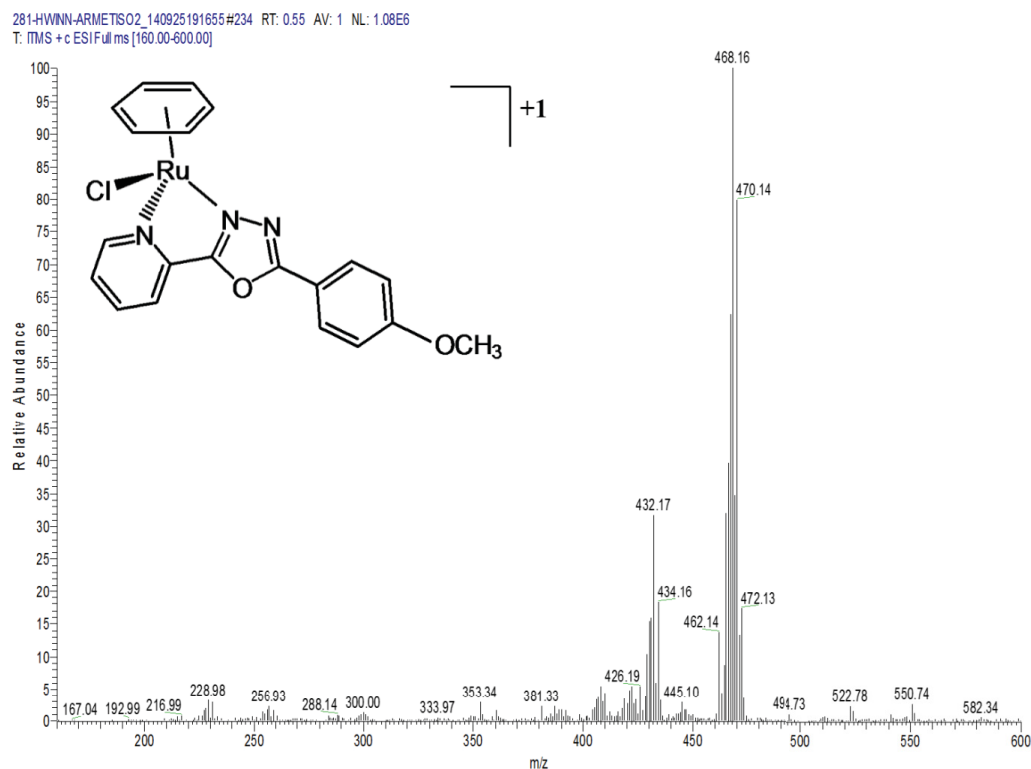


Figura 4.12. Espectro de ESI-MS do composto **4b**. Observa-se o pico mais intenso referente ao íon molecular, à espécie $[\text{RuO}_2\text{N}_3\text{ClC}_{20}\text{H}_{17}]^+$ (**4b**- PF_6)⁺ e o pico em m/z 432.17 referente a espécie $[\text{RuO}_2\text{N}_3\text{C}_{20}\text{H}_{17}]^{2+}$.

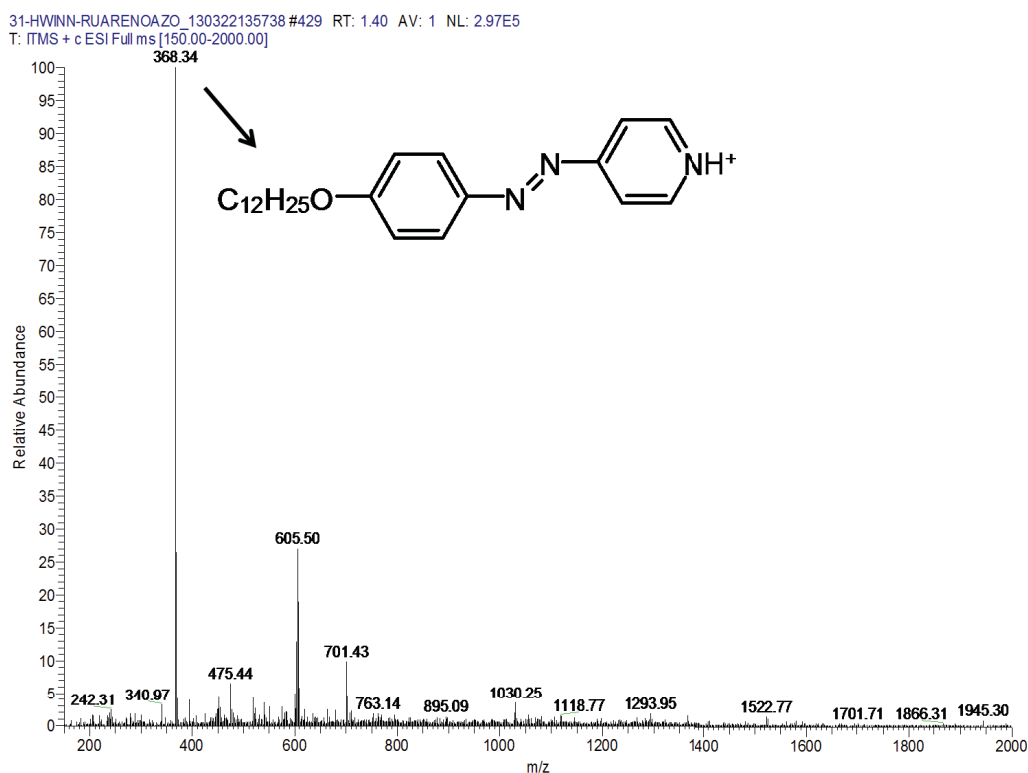


Figura 4.13. Espectro ESI-MS do composto **1a**. O pico de maior intensidade referente ao ligante (L1a) 4-(4'-dodeciloxifenilazo)piridina. Adição de ácido acético para protonar a espécie e formar cátion.

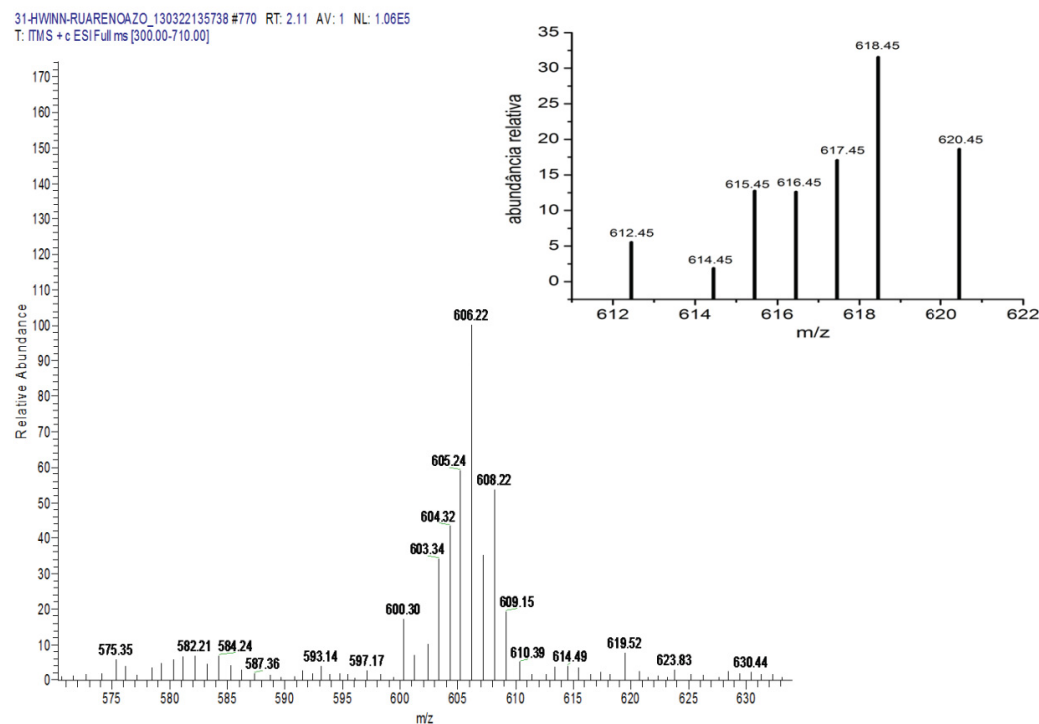


Figura 4.14. Espectro ESI-MS do composto **1a**. Expansão do conjunto de picos isotópicos centrados m/z em 606.22. Na inserção o gráfico simulado considerando apenas a distribuição isotópica do rutênio na molécula esperada $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)(\text{L1a})\text{Ru}(\text{CH}_3\text{COO})]^+$.

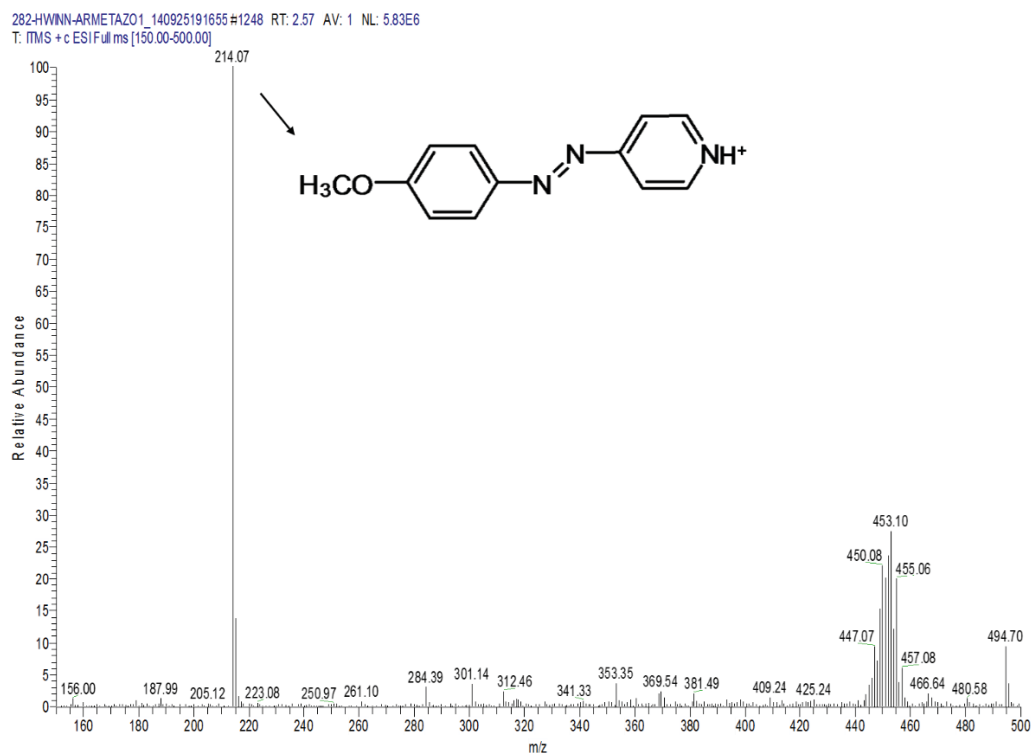


Figura 4.15. Espectro ESI-MS do composto **1b**. O pico de maior intensidade referente ao ligante (L1b), 4-(4'-metoxifenilazo)piridina. Adição de ácido acético para protonar a espécie e formar cátion.

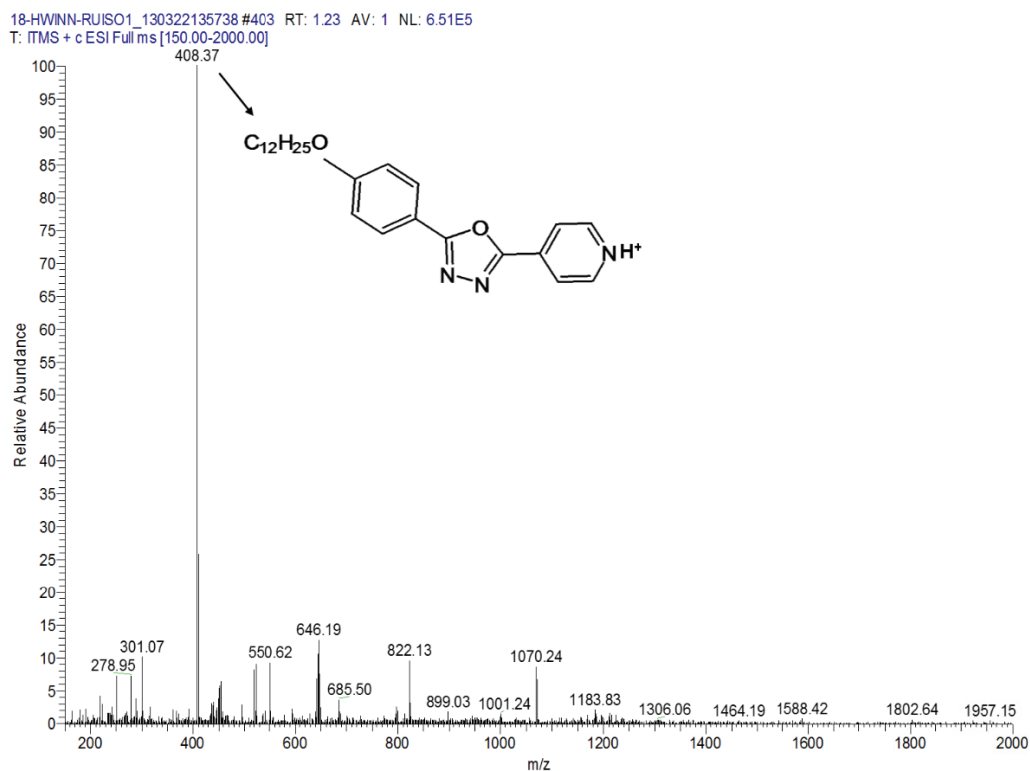


Figura 4.16. Espectro ESI-MS do composto **3a**. O pico de maior intensidade do ligante (L3a) 4-((4-dodeciloxyfenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina. Adição de ácido acético para protonar a espécie e formar cátion.

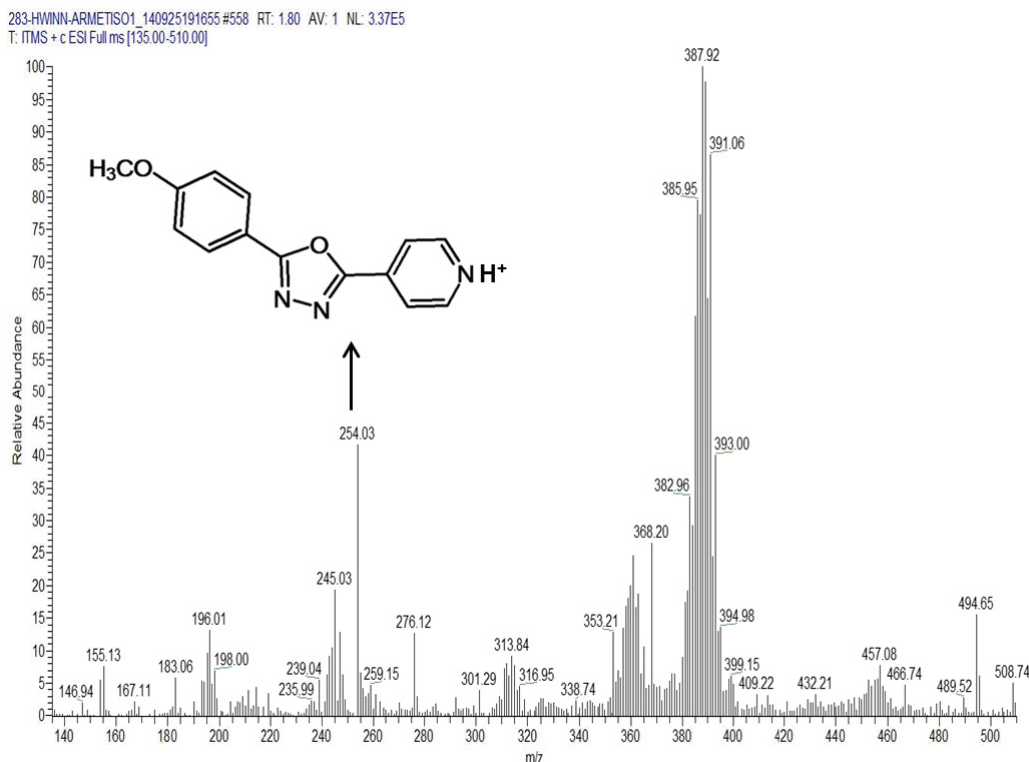


Figura 4.17. Espectro ESI-MS do composto **3b**. O pico do ligante (L3b) 4-((4-metoxifenil)-1,3,4-oxidiazol}piridina. Adição de ácido acético para protonar a espécie e formar cátion.

4.4. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros na região do infravermelho dos compostos do grupo I (Figura 4.18) e II (Figura 4.19) apresentam bandas coerentes com a presença da unidade $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}]_2\text{Cl}_2$ e dos ligantes **L1a**, **L1b**, **L2a**, **L2b**, **L3a**, **L3b**, **L4a** e **L4b** (Tabela 4.10). Todos os compostos exibiram bandas de estiramentos dos grupos CH aromáticos (ν_{CH}) em torno de 3065 cm^{-1} e também as bandas em aproximadamente 1600 (ν_{CC}), 1500 e 1400 (ν_{CN}), 1260 (ν_{asCOC}), 1140 (δ_{CH}) e 1020 (ν_{sCOC}).

Para os compostos de cadeia longa, **1a**, **2a**, **3a** e **4a**, os espectros exibiram bandas intensas referentes aos estiramentos do grupo CH_2 alifáticos (ν_{CH}) em torno de 2920 e 2850 cm^{-1} . Os compostos bidentados, **2a**, **2b**, **4a** e **4b**, exibiram banda intensa de estiramento do contra íon PF_6^- (ν_{PF}) e com sobreposição de modos em torno de 830 cm^{-1} e Os compostos monodentados, **1a**, **1b**, **3a** e **3b**, exibiram ainda bandas em torno de 830 cm^{-1} (π_{CH}) e os compostos do grupo I; **1a**, **1b**, **2a** e **2b**, exibiram bandas em torno de 560 cm^{-1} (π_{CC}).

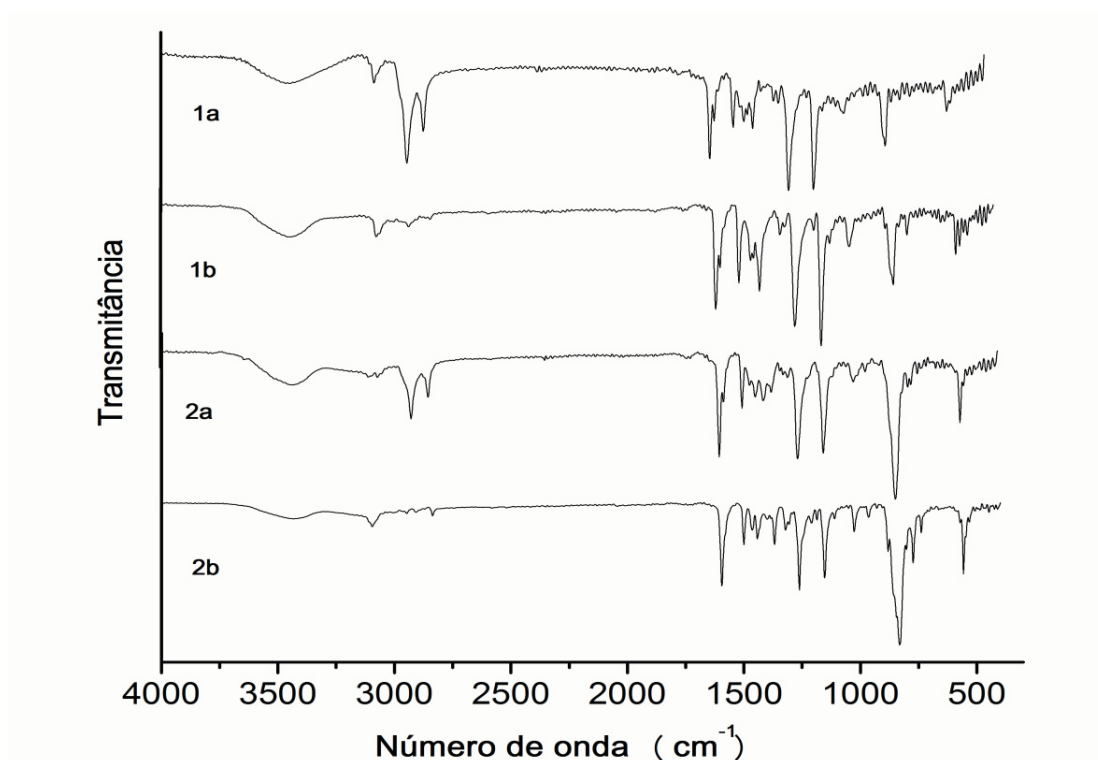


Figura 4.18. Espectros de infravermelho do grupo I: **1a**, **1b**, **2a** e **2b**.

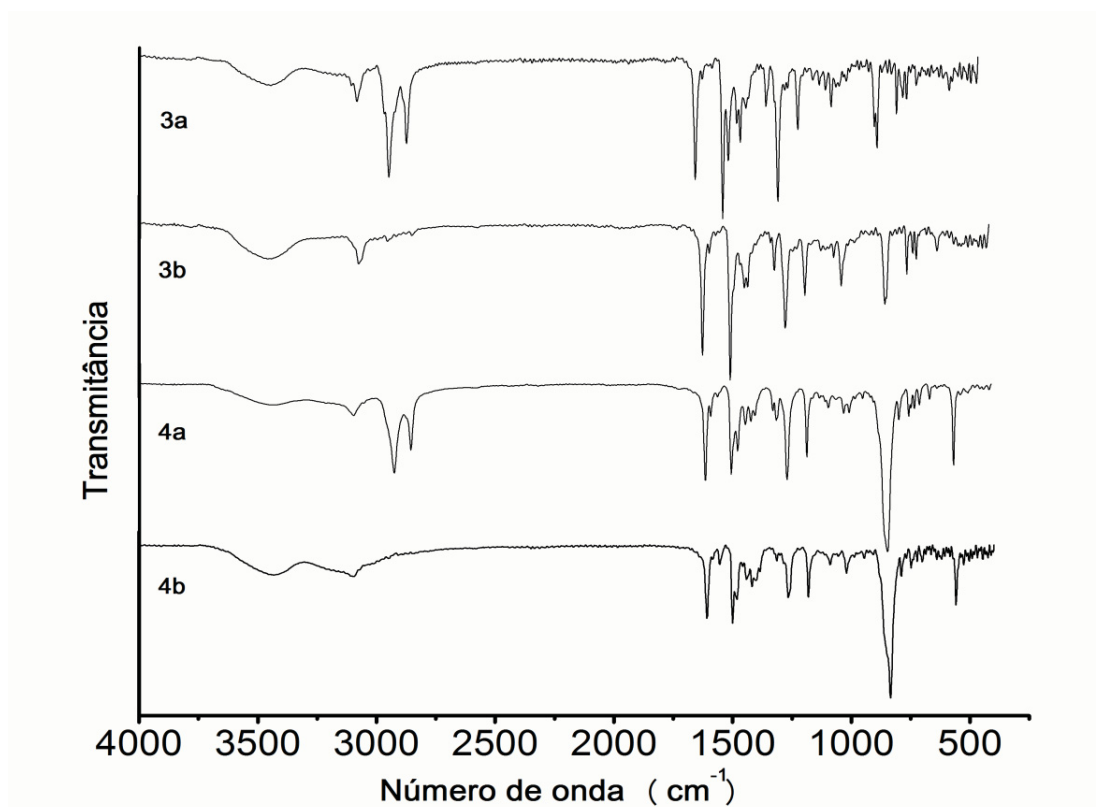


Figura 4.19. Espectros de infravermelho do grupo II: **3a**, **3b**, **4a** e **4b**.

Tabela 4.10. Valores das bandas dos espectros de FTIR e suas respectivas atribuições.

1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	Atribuições
Número de onda/cm ⁻¹								
3066	3066	3109	3094	3065	3069	3094	3094	ν_{CH} (aromático)
2924	-	2924	-	2928	-	2923	-	ν_{CH} (alifático)
2853	-	2851	-	2853	-	2853	-	ν_{CH} (alifático)
1599	1599	1597	1596	1613	1613	1609	1609	ν_{CC}
1497	1499	1499	1466	1495	1495	1499	1500	ν_{CN}
1412	1410	1409	1370	1420	1422	1438	1420	ν_{CN}
1254	1258	1260	1262	1258	1262	1262	1265	$\nu_{as COC}$
1146	1144	1150	1154	1173	1179	1179	1181	δ_{CH}
1015	1023	1020	1027	1030	1025	1025	1021	$\nu_s COC$
832	832	-	-	843	840	-	-	π_{CH}
-	-	838	832	-	-	838	836	ν_{PF}
564	562	560	558	-	-	-	-	π_{CC}

4.5. Espectroscopia eletrônica UV-visível

No espectro eletrônico do complexo precursor $[(\eta^6-C_6H_6)ClRu]_2Cl_2$ (Figura 4.20) são observadas as bandas MLCT $C_6H_6 \leftarrow Ru$ entre 347 e 405nm e LMCT $Ru \leftarrow Cl$ em 612nm.¹²⁴ Os espectros eletrônicos dos ligantes, **L1a**, **L1b**, **L2a**, **L2b**, **L3a**, **L3b**, **L4a** e **L4b**, podem ser observados na figura 4.21. Os ligantes derivados de azopiridina, **L1a**, **L1b**, **L2a** e **L2b** (Figura 4.21 A) exibem bandas características do grupo azo em 250 (banda E - $\pi^* \leftarrow \pi$, encoberta pelo solvente), 356 (banda K) e 454 nm (banda R - $n \rightarrow \pi^*$).¹²⁵ A banda intensa K foi atribuída a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, que envolve a transferência

de carga do grupo azo para o grupo fenila, por isso essa banda é larga como uma banda MLCT, diferente das transições $\pi^* \leftarrow \pi$ localizadas em anéis aromáticos.¹²⁶ Os ligantes derivados de oxadiazopiridina, **L3a**, **L3b**, **L4a** e **L4b** (Figura 4.21 B) exibem bandas em 306 nm referente a transição $\pi^* \leftarrow \pi$ do grupo oxadiazó.

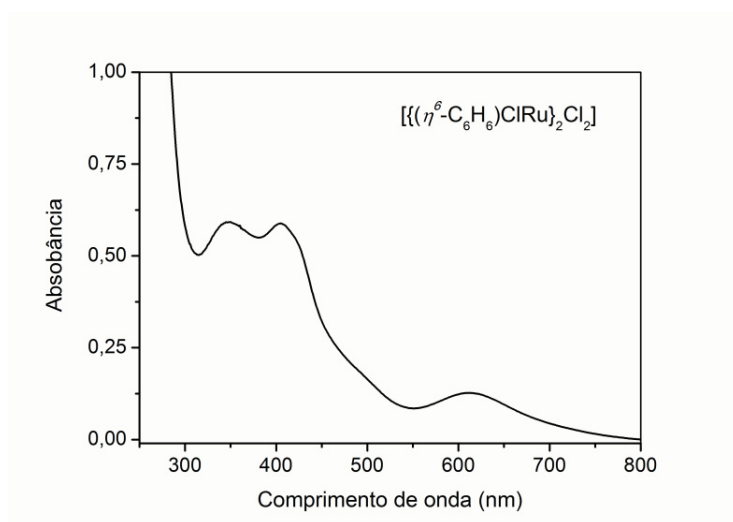


Figura 4.20. Espectro eletrônico do complexo precursor $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{ClRu}]_2\text{Cl}_2$ em DMSO.

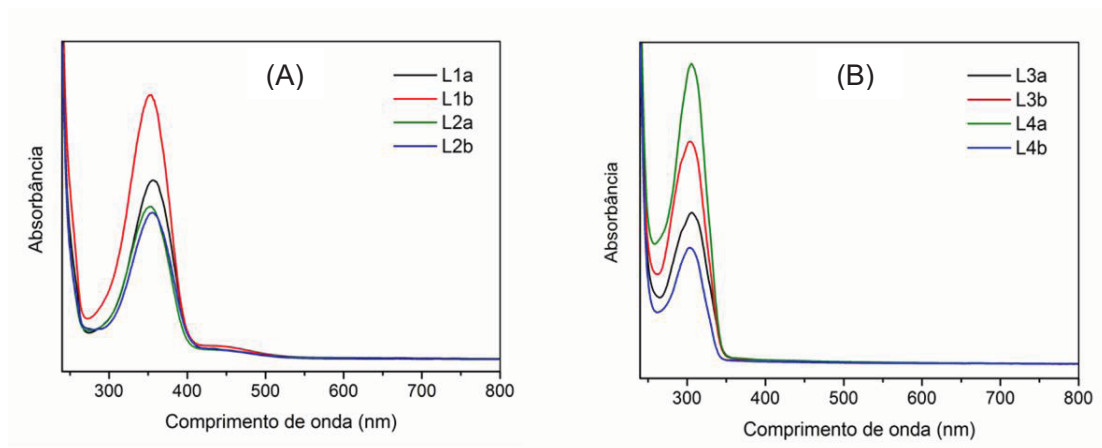


Figura 4.21. Espectros eletrônicos dos ligantes (A) 4-(4'-dodeciloxifenilazo)piridina (L1a), 4-(4'-metoxifenilazo)piridina (L1b), 2-(4'-dodeciloxifenilazo)piridina (L2a) e 2-(4'-metoxifenilazo)piridina (L2b); (B) 4-{(4-dodeciloxifenil)-1,3,4-oxidiazó}piridina (L3a), 4-{(4'-metoxifenil)-1,3,4-oxidiazó}piridina (L3b), 2-{(4-dodeciloxifenil)-1,3,4-oxidiazó-2-il}piridina (L4a) e 2-{(4'-metoxifenil)-1,3,4-oxidiazó-2-il}piridina (L4b) em clorofórmio.

As bandas intensas $\pi^* \leftarrow \pi$ dos ligantes no espectro UV, são deslocadas para o vermelho nos complexos de η^6 -arenorutênio(II). Os azo-complexos **1a** e **1b** exibem a banda $\pi^* \leftarrow \pi$ em 380nm (Figura 4.22 A), com absorvidade molar (ϵ) de 22500 e 22050 L.mol⁻¹.cm⁻¹, respectivamente, enquanto que **2a** e **2b** apresentam essa banda em 452nm (Figura 4.22 B) com valores de ϵ de 23800 e 4160 L.mol⁻¹.cm⁻¹, respectivamente. Essas bandas apresentam-se mais largas, em comparação aos ligantes livres, provavelmente devido à presença das bandas MLCT, do precursor, encobertas. É observada também outra banda $\pi^* \leftarrow \pi$, com máximos em 250nm (**1a** e **1b**) e 260nm (**2a** e **2b**). O composto **2b** exibe mais uma banda em 640nm atribuída a LMCT Ru \leftarrow Cl. Os oxadiazó-complexos **3a** e **3b** exibem a banda $\pi^* \leftarrow \pi$ em 333nm (Figura 4.22 C), com valores de ϵ de 29300 e 20600 L.mol⁻¹.cm⁻¹, respectivamente, e **4a** e **4b** (Figura 4.22 D) apresentam essa banda em 336nm, com valores de ϵ de 22050 e 12100 L.mol⁻¹.cm⁻¹, respectivamente. Outra banda $\pi^* \leftarrow \pi$ é observada em 240nm (**3a** e **3b**) e 270nm (**4a** e **4b**).

As bandas $\pi^* \leftarrow \pi$ dos compostos catiônicos (**2a**, **2b**, **4a** e **4b**) são mais deslocadas para o vermelho em comparação as bandas dos compostos neutros (**1a**, **1b**, **3a** e **3b**). Isso pode ser justificado pela ligação quelada dos ligantes azopiridina e oxadiazopiridina ao centro de rutênio nos compostos **2a**, **2b**, **4a** e **4b**. A formação da ligação quelada é favorecida por preencher elétrons nos orbitais t_{2g} do rutênio, que permite que ele atue como π -doador e então transfira densidade eletrônica para os orbitais π^* vazios do anel, estabilizando esses orbitais, levando a uma diminuição de energia entre os orbitais π e π^* .^{127, 128}

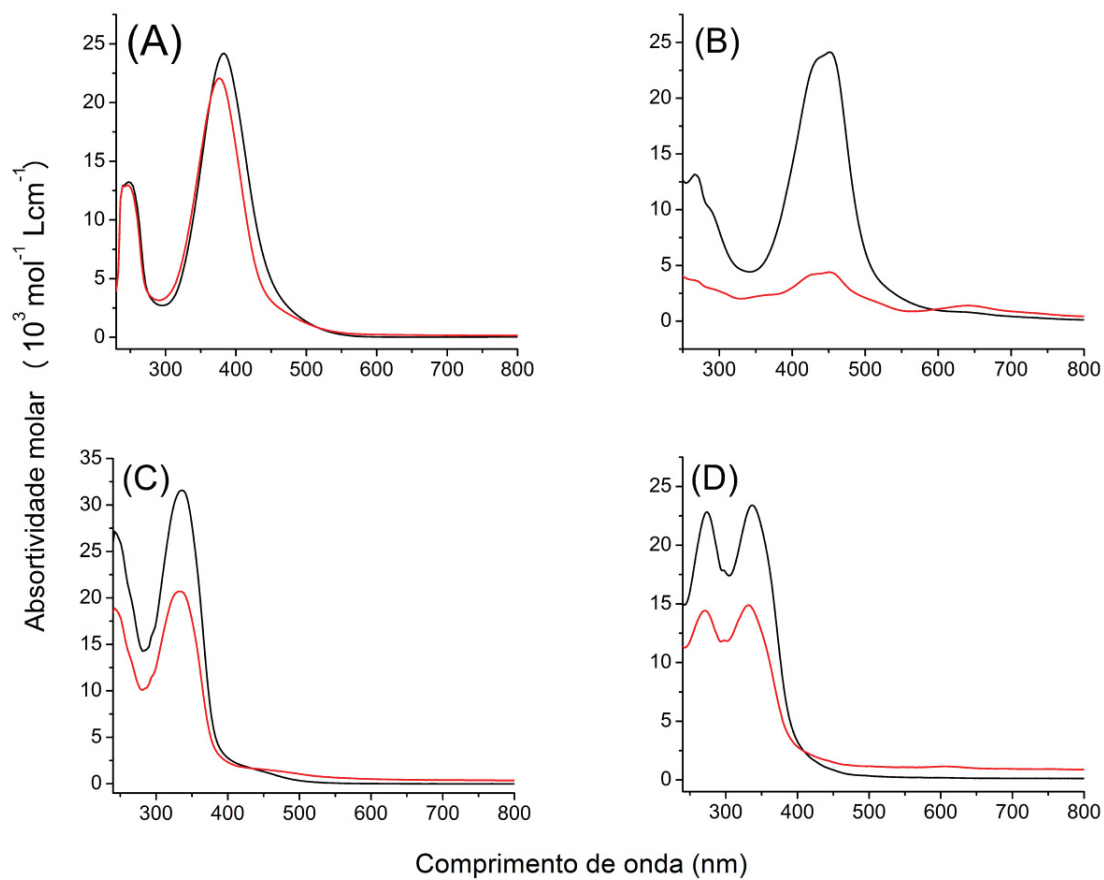


Figura 4.22. Espectros eletrônicos dos complexos de η^6 -areneorutênio (II) com (linha preta) dodeciloxi e (linha vermelha) metoxi fenil azo- (A) **1a** e **1b**, (B) **2a** e **2b**; e oxadiazol- compostos (C) **3a** e **3b**; (D) **4a** e **4b** em clorofórmio.

4.6. Voltametria cíclica e espectroeletroquímica UV-visível

O comportamento eletroquímico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo I foi estudado por voltametria cíclica e espectroeletroquímica UV-Vis. Os compostos do grupo II não exibiram processos faradaicos na janela de trabalho da solução eletrolítica empregada na voltametria cíclica. Então, somente os compostos **1a**, **1b**, **2a** e **2b** foram avaliados por voltametria cíclica.

4.6.1. Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos dos ligantes derivados de azopiridina **L1a** e **L1b** (Figura 4.23 A) apresentaram um processo reversível com $E_{1/2} = -1.02$ e -1.05 V e os ligantes **L2a** e **L2b** (Figura 4.23 B) apresentaram uma redução irreversível em $E_{pc} = -1.18$ e -1.20 V, respectivamente. Esses processos podem ser atribuídos à redução de 1 elétron no orbital π^* do grupo fenilazo para seu ânion radical ($-N=N- \rightarrow \{-N=N-\}^{\cdot-}$).¹²⁹

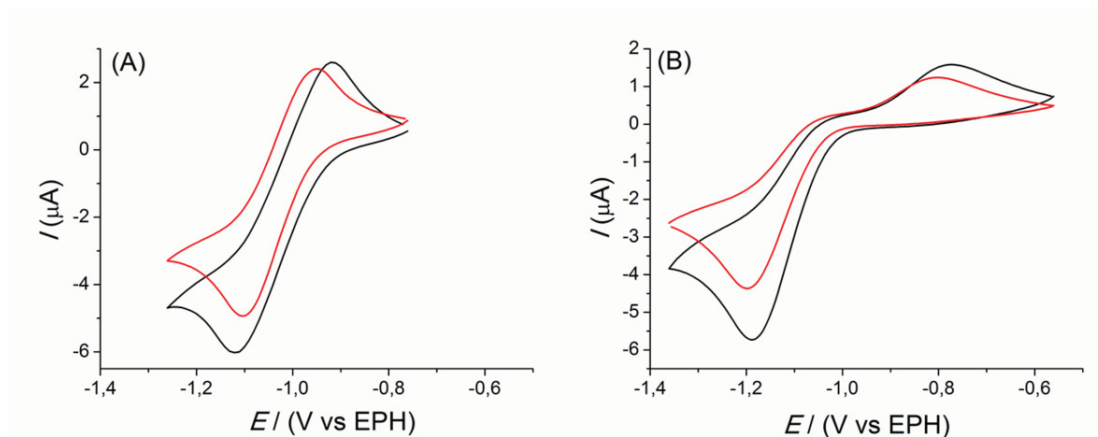


Figura 4.23. Caracterização eletroquímica dos ligantes **L1a**, **L1b**, **L2a** e **L2b**. Voltamogramas cíclicos dos ligantes (A) **L1a** e (B) **L2a** (linha preta); e (A) **L1b** e (B) **L2b** (linha vermelha) obtidos a partir de soluções de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 e solução eletrolítica de 0.1 mol L^{-1} de TBAClO_4 , na velocidade de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Os voltamogramas cíclicos dos compostos do grupo I (**1a**, **1b**, **2a** e **2b**) são caracterizados por uma redução irreversível em -0,8 V para os compostos **1a** e **1b** (Figura 4.24) e -0,15V e -0,19V para os compostos **2a** e **2b** (Figura 4.25 A e B) em diclorometano. Em acetonitrila, o composto **2a** e **2b** mostra o potencial de redução deslocado para -0,2 V (Figura 4.25 C e D), seguido de um segundo processo de redução, sendo o produto dessa redução oxidado em 0,1V, esse segundo processo aparece somente no segundo ciclo da voltametria cíclica. A Tabela 4.3 mostra valores de pico de potencial para compostos do grupo I. Os compostos do grupo II não sofreram nenhum processo redox na janela de potencial analisada.

O processo redox observado nos voltamogramas cíclicos dos complexos grupo I foram atribuídos à redução de 1 elétron no orbital π^* do grupo fenilazo para seu ânion radical ($-N=N- \rightarrow \{-N=N-\}^{\cdot-}$)¹²⁹, análogo ao observado para os ligantes livres. Essa redução encontra-se deslocada para potenciais mais positivos em relação aos ligantes livres. Os compostos **1a** e **1b** encontram-se deslocados +0,25V, e os compostos **2a** e **2b** deslocados +1,02V em relação aos ligantes livres (Tabela 4.11). Para os compostos **2a** e **2b**, essa redução ocorre em potenciais mais positivos do que os compostos **1a** e **1b**, pois a ligação bidentada ao Ru^{2+} estabiliza o orbital π^* , conforme discutido na caracterização espectroscópica, tornando o processo de redução mais acessível. Dougan *et al.*⁵² também relataram compostos análogos ao estudado nesta tese, $[(\eta^6\text{-areno})Ru(\text{azpy})]^{+}$ (onde areno = *p*-cimeno ou bifenil e azpy = N,N-dimetilfenil- ou hidroxifenil-azopiridina), onde os potenciais de redução dos ligantes livres foram deslocados para potenciais mais positivos quando coordenados ao centro de rutênio em aproximadamente +0,55V. Os potenciais de redução mais positivos do processo localizado no ligante faz com que esse processo seja mais acessível meio biológico, o que será discutido nos capítulos 6 e 7.

Para os compostos **2a** e **2b**, o segundo processo de redução foi observado no segundo ciclo da voltametria cíclica, e o produto desta redução oxida em 0,1V, o que é mais evidenciado em acetonitrila (Figura 4.25 C e D) do que em diclorometano (Figura 4.25 A e B). O produto dessa redução é seguido por uma reação química acoplada e não por uma reoxidação reversível.^{52, 130} Segundo Patai *et al.*¹³¹, grupos azo geralmente dão origem a dois processos de reduções eletroquímicas que aparecem

separados em solventes apróticos e polares. Então provavelmente os processos de redução observados em **2a** e **2b** em acetonitrila é um indicativo da influência do solvente acetonitrila, já que em diclorometano esse processo foi menos evidenciado, sendo que diclorometano é menos polar que acetonitrila.

A coordenação de ligantes fenilazo ao centro de rutênio confere maior estabilidade ao complexo, elevando ainda mais o potencial de redução do par Ru(III/II). Isso ocorre no complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{fenilazo})\text{Cl}]^+$ que foi descrito pelo nosso grupo de pesquisa.¹³² A coordenação do ligante fenilazo monodentado desloca o potencial $E_{1/2}$ ($\text{Ru}^{3+/2+}$) para +0,49V em relação ao complexo precursor $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$. Deste modo, o processo redox associado ao centro metálico não observado na voltametria cíclica para todos os compostos se deve ao fato deste se encontrar em potencial mais positivo que o limite superior da janela de trabalho da solução eletrolítica ($E_{1/2} > 2,00\text{V}$).

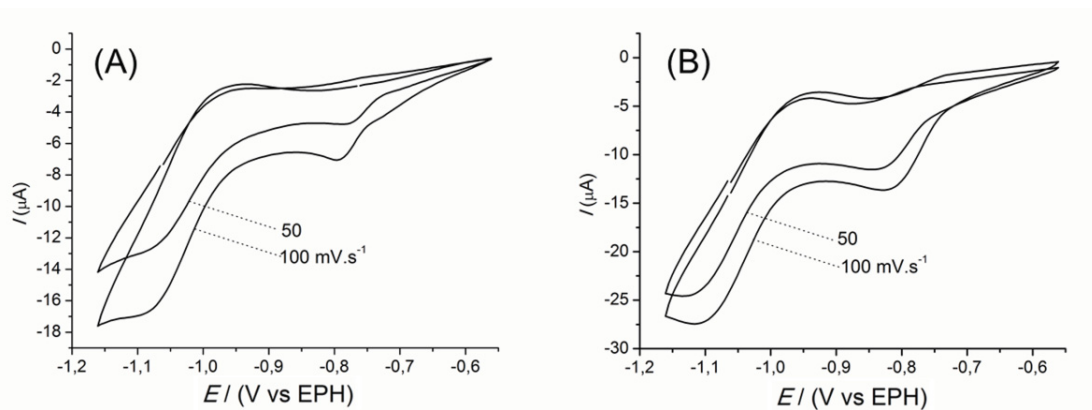


Figura 4.24. Caracterização eletroquímica dos compostos **1a** e **1b**. Voltamogramas Cíclicos dos compostos (A) **1a** e (B) **1b**, obtidos a partir de soluções de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 e solução eletrolítica de $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de TBAClO_4 , em duas velocidades (50 e $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$).

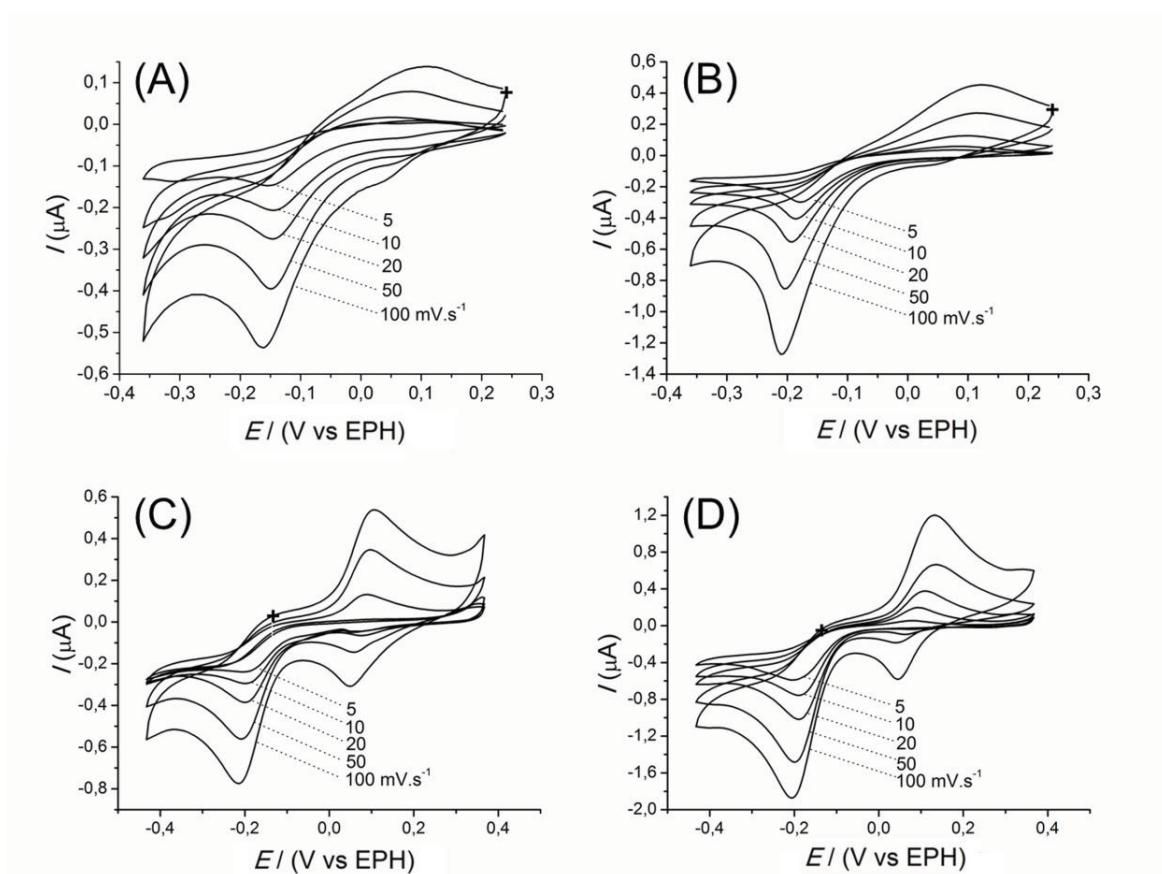


Figura 4.25. Caracterização eletroquímica dos compostos **2a** e **2b**. Voltametria cíclica dos compostos (A) **2a** e (B) **2b** em CH_2Cl_2 , compostos (C) **2a** e (D) **2b** em CH_3CN . Obtidos a partir de soluções de $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dos compostos e solução eletrolítica de 0.1 mol L^{-1} de TBAClO_4 , em cinco velocidades (5, 10, 20, 50 e $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

Tabela 4.11. Potenciais de pico catódicos e potenciais de meia onda obtidos dos voltamogramas cíclicos dos compostos η^6 -arenerutênio (II) do grupo I e dos ligantes derivados de azopiridina.

Compostos	E_{pc} (V vs EPH)	$E_{1/2}$ (V vs EPH)
L1a	-0.92 [*]	-1.05 [*]
L1b	-0.95 [*]	-1.02 [*]
L2a	-1.18 [*]	
L2b	-1.20 [*]	
1a	-0.80 [*]	
1b	-0.83 [*]	
2a	-0.15 [*]	-0.22 [#]
2b	-0.19 [*]	-0.21 [#]

dados obtidos em ^{*}CH₂Cl₂ e em [#]CH₃CN.

4.6.2. Espectroeletróquímica UV-visível

A espectroeletróquímica UV-vis foi realizada apenas para o composto **2a**, devido a similaridade do comportamento redox observado para o composto **2b**. Desta forma, as mudanças espectrais esperadas devem ser equivalentes, o que levariam as mesmas conclusões.

A Figura 4.26 mostra a variação espectral do composto **2a** mediante a aplicação de dois valores de potencial: o primeiro valor de potencial aplicado de -0.08V (linha preta) durante 15 minutos, e após um segundo valor de potencial aplicado de -0.43V (linha vermelha), por mais 15 minutos. O espectro eletrônico do composto inicial (forma oxidada) apresenta uma banda π - π^* em 452nm. A aplicação do potencial de -0.08V não alterou o espectro eletrônico, porém a aplicação do potencial -0.43V levou a diminuição da intensidade dessa banda π - π^* (linha azul) e deslocamento para 416 nm.

Mesmo com a aplicação de potencial suficiente para total redução, não houve total extinção dessa banda.

A não alteração da banda com a aplicação do potencial de -0.08V comprova que o segundo processo observado na voltametria cíclica é acoplado ao primeiro processo de redução que ocorre em -0.2V. As mudanças espectrais observadas ao se aplicar o potencial de -0.43V foram similares aos resultados observados na espectroeletroquímica do composto $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{fenilazo})\text{Cl}]^+$,¹³² reforçando nossa atribuição de redução localizada no ligante fenilazo.

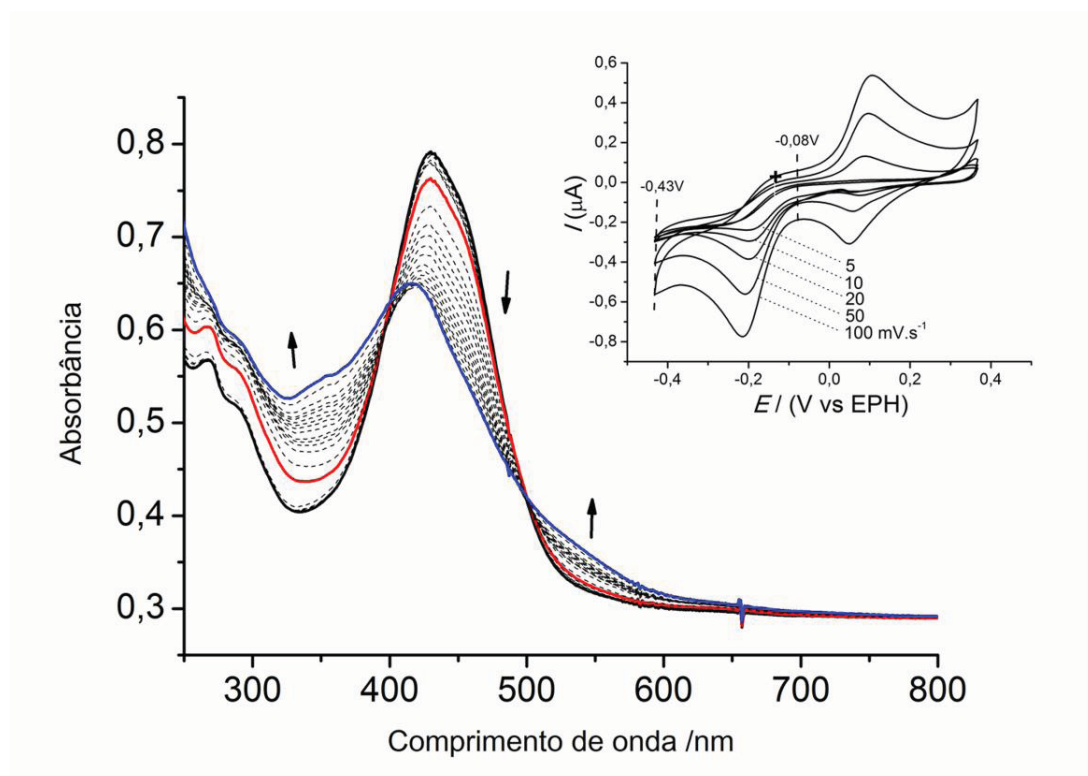


Figura 4.26. Espectroeletroquímica UV-Vis do composto **2a**, obtidos a partir de soluções $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em CH_3CN , aplicando os potenciais de -0.08V (linha preta) e -0.43V (linha vermelha) durante 15 minutos cada. Na inserção o voltamograma cíclico do composto **2a**.

4.7. Conclusões parciais

Os compostos foram sintetizados, purificados e caracterizados. Os resultados de RMN de ^1H , FTIR, UV-vis indicam que as estruturas idealizadas foram obtidas pelas sínteses.

Os ligantes fenilazo e feniloxadiazo possuem um alto caráter π -aceitador. A ligação ao centro de Ru(II) leva a uma estabilização dos orbitais π do ligante, que resulta no deslocamento das transições $\pi^* \leftarrow \pi$ dos ligantes para o vermelho dos complexos de η^6 -arenorutênio nos espectros UV-vis e deslocamento para valores mais positivos do potencial de redução do ligante feniazol coordenado. O forte caráter π -aceitador estabiliza os complexos de rutênio em seu estado de oxidação mais baixo e desloca o potencial redox para valores acima do limite superior da janela de trabalho da voltametria cíclica, impedindo sua visualização. Esses efeitos fornecem condições de compatibilidade para reações redox em meio biológico apenas ao processo localizado no ligante, podendo gerar comportamento distintos nesse meio. Em meio biológico, o centro metálico é susceptível apenas a reações de substituição.

Capítulo 5:

Substituição de ligantes nos compostos η^6 -arenorutênio(II)

Capítulo 5 – Substituição de ligantes nos compostos de η^6 -arenorutênio(II)

De acordo com Sadler e colaboradores⁴⁹ os complexos de η^6 -arenorutênio(II) podem sofrer hidrólise da ligação Ru-Cl formando espécies de aquorutênio, que são mais reativos a substituição.⁵³ Esse complexo resultante da hidrólise pode ligar-se as nucleobases do DNA, como a guanina N7, através da coordenação do metal, enquanto que os ligantes aromáticos podem intercalar às nucleobases, dependendo da sua estrutura. Os compostos com dupla ação (intercalação nos pares de bases e coordenação do metal nas bases do DNA) promovem a distorção incomum do DNA que afeta o reconhecimento de enzimas de reparo, levando a apoptose e morte celular.¹³³ De acordo com Scolaro *et al.*³⁰ isso pode explicar a citotoxicidade dessa classe de compostos. No entanto, apesar dessa relativa labilidade do ligante cloreto devido ao efeito *trans*-labilizante promovido pelo ligante benzeno, Dougan *et al.*⁵³ demonstraram em alguns artigos^{49, 52, 134} que tanto o ligante cloreto quanto o benzeno, ou mesmo o terceiro ligante são susceptíveis a substituição. Deste modo, a fim de caracterizar possíveis reações de substituição ocorridas em solução antes de incorporação celular, ou no meio intracelular dos complexos estudados nesta tese, o que poderia levar a um melhor entendimento das propriedades citotóxicas, foram realizados ensaios para verificar a estabilidade, substituição de ligantes e a cinética de reação de substituição dos complexos η^6 -arenorutênio(II) em solução aquosa e em DMSO.

5.1. Estudo da estabilidade

Tendo em vista a importância das reações em meio aquoso dos complexos de η^6 -arenorutênio(II) no mecanismo biológico de ação antitumoral, primeiramente realizamos estudos da estabilidade dos compostos de η^6 -arenorutênio(II). A estabilidade dos compostos foi estudada utilizando a espectroscopia eletrônica UV-Vis

em várias condições, mantendo a temperatura ambiente $T = 27^\circ\text{C}$: *i*) em PBS (tampão fosfato salino) contendo 1% de DMSO (Figura 5.1); *ii*) em DMSO (Figura 5.2); *iii*) em H_2O contendo 1% de DMSO e 0,017 mmol de AgNO_3 (Figura 5.3); ao longo de 72 horas. Essas condições retratam as que foram utilizadas nos ensaios biológicos (Cap. 6 e 7).

Inicialmente foram estudados somente um composto de cada grupo, o composto **2b** do grupo I e o composto **4b** do grupo II, ambos catiônicos. O espectro UV-vis à temperatura ambiente do composto **2b** (Figura 5.1A) após a dissolução em 1% de DMSO e PBS exibe uma intensa banda $\pi^* \leftarrow \pi$ em 428nm, que muda (ao longo das 72h) para 420nm e ocorre diminuição na absorbância, indicando que a espécie inicial está sendo consumida e outra espécie está sendo formada como produto de uma possível hidrólise (ou substituição por DMSO). A mudança espectral é caracterizada pelo ponto isosbético em 500nm. Outra banda surge em torno de 700nm ao longo das 72h de reação. O composto **4b** (Figura 5.1B) após a dissolução em 1% de DMSO e PBS exibe duas bandas $\pi^* \leftarrow \pi$ em 273 e 317nm, que deslocam-se para 250 e 316nm ao longo das 72h. Com base nos resultados de espectrometria de massa, discutido no Capítulo 4 item 4.3, onde foi observada a saída do ligante cloreto e coordenação do íon acetato e de acordo com as mudanças espectrais observadas no espectro UV-vis dos compostos **2b** e **4b** que indicam uma mudança na esfera de coordenação, a primeira hipótese é que poderia estar ocorrendo hidrólise através da saída do ligante cloreto, embora ainda não saibamos a natureza exata desse produto até este momento. No entanto, podemos descartar a possibilidade de que os ligantes azo/oxadiazó estejam se descoordenando, pois nenhuma das mudanças espectrais corresponde à presença desses ligantes livres em solução. De acordo com Wang *et al.*¹³⁵ e Scolaro *et al.*³⁰ mudanças espectrais como o deslocamento para UV e alteração na intensidade de absorbância de complexos de η^6 -arenorutênio(II) em meio aquoso caracterizam a formação de complexo aquorutênio, com a saída do ligante cloreto.

A fim de investigar se as mudanças espectrais também ocorreriam no solvente DMSO, que é uma espécie mais coordenante que água, foi realizado o experimento com os compostos **2b** e **4b** em solução de DMSO, uma vez que esse solvente é o veículo de dissolução desses compostos nos ensaios biológicos. A figura 5.2 mostra os

espectros UV-vis dos compostos **2b** e **4b** em solução de DMSO à temperatura ambiente ao longo de 72h. O composto **2b** (Figura 5.2A), logo após a diluição em DMSO exibe a banda $\pi^* \leftarrow \pi$ em 432nm e após 72h o espectro exibe a banda $\pi^* \leftarrow \pi$ deslocada para 423nm. O perfil espectral da banda muda logo após as primeiras 3h de reação, indicando a formação de uma nova espécie, que possui ligação Ru-DMSO formado ao longo das 72h. O composto **4b** (Figura 5.2B) exibe as duas bandas $\pi^* \leftarrow \pi$ em 274 e 325nm logo após a diluição em DMSO, sendo que ao final das 72h foi observada apenas uma banda $\pi^* \leftarrow \pi$ em 305nm. Nesse caso, a mudança espectral também ocorre nas primeiras 3h de reação, sendo observada apenas uma banda de absorção, indicando a formação de uma (ou mais) espécie(s) Ru-DMSO.

Nessa condição as mudanças espectrais observadas foram similares, mas as alterações ocorrem de maneira mais rápida do que em meio aquoso contendo 1% de DMSO, provavelmente porque DMSO está mais concentrado.

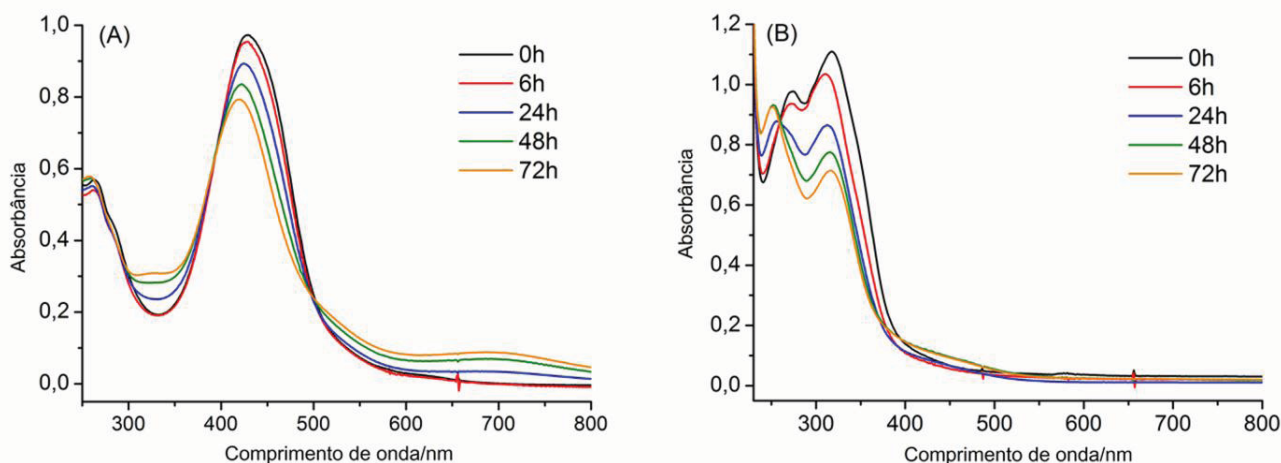


Figura 5.1. Espectros UV-Vis dos compostos (A) **2b** e (B) **4b** ($15\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dependentes do tempo em 1% DMSO e PBS à temperatura ambiente.

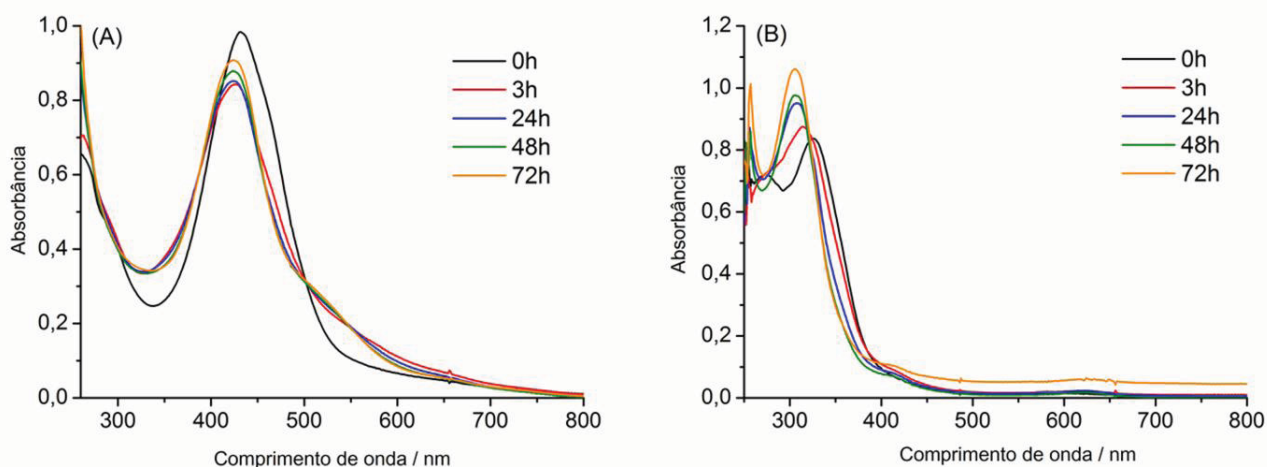


Figura 5.2. Espectros UV-Vis dos compostos (A) **2b** e (B) **4b** ($15\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dependentes do tempo em DMSO à temperatura ambiente.

De acordo com os resultados obtidos até o momento, a hipótese é a ocorrência de hidrólise/solvólise através da saída do ligante cloreto. Para tentar explicar essa mudança espectral observada em solução aquosa e em DMSO, estudamos uma terceira condição, em solução aquosa com a adição de Ag^+ . A adição de prata deve promover a substituição do ligante cloreto do composto formando AgCl , pois a ligação Ru-Cl é bastante lábil,⁷ e consequentemente deve formar um complexo aquorutênio de maneira mais rápida que nas condições anteriores. Foi observado que com a adição de Ag^+ houve aceleração da mudança espectral, deslocamento da banda para o UV e diminuição da absorbância, que foram as mesmas alterações observadas nas figuras 5.1 e 5.2. Assim, a dissociação do composto **2b** e **4b** resultou na diminuição da sua concentração em solução, coerente com a hidrólise da ligação Ru-Cl . A ocorrência de hidrólise pode estar relacionada ao efeito de danos a biomoléculas, podendo resultar em citotoxicidade.

Há relatos de que a hidrólise de complexos η^6 -arenorutênio(II) é suprimido fora das células, uma vez que na corrente sanguínea existe uma alta concentração de íons cloreto ($103\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e no meio intracelular, a concentração de íons cloreto é significativamente menor, aproximadamente $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, o que favoreceria a hidrólise pela saída do ligante cloreto. Para suportar nossa hipótese que os compostos **2b** e **4b** estão sofrendo hidrólise/solvólise pela saída do cloreto, investigamos o que ocorreria

com o composto **2b** em soluções de NaCl de concentrações representativas do plasma sanguíneo ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e intracelulares ($4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) monitoradas através da espectroscopia UV-vis à temperatura ambiente por 72h (figura 5.4). Os resultados mostraram que em ambas as concentrações de NaCl ocorrem as mesmas mudanças observadas nas figuras 5.1 e 5.2. Além disso, essas mudanças ocorreram na mesma velocidade, revelando que a alta concentração de cloreto não suprime as mudanças. Portanto, estes resultados indicam que a reação de hidrólise da ligação Ru-Cl não é a única e/ou a principal reação que está ocorrendo.

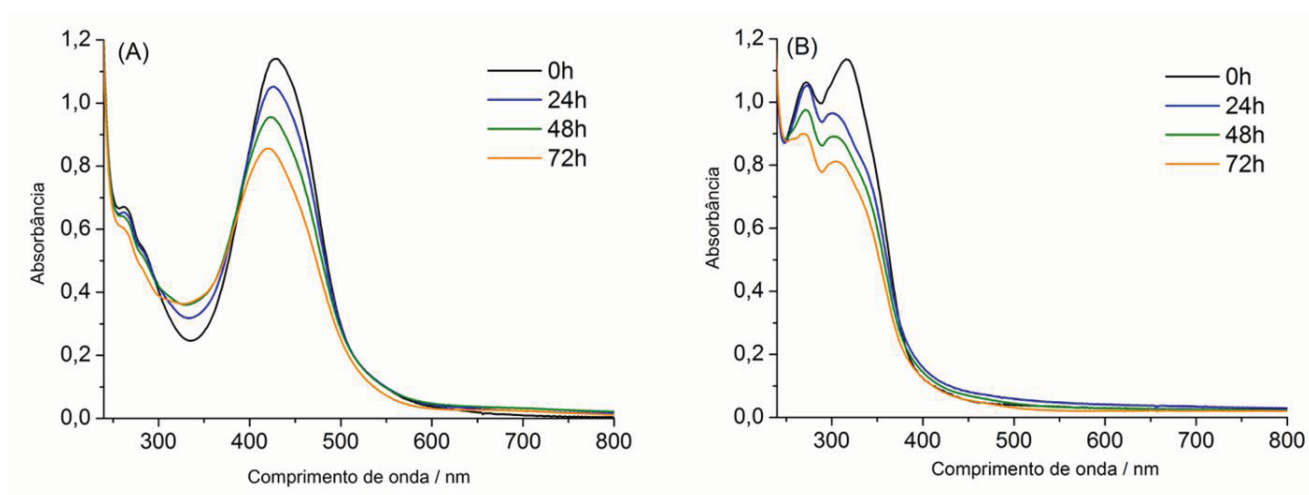


Figura 5.3. Espectros UV-Vis dos compostos (A) **2b** e (B) **4b** ($15\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dependentes do tempo em H_2O contendo 1% de DMSO e $0,017 \text{ mmol}$ de AgNO_3 à temperatura ambiente.

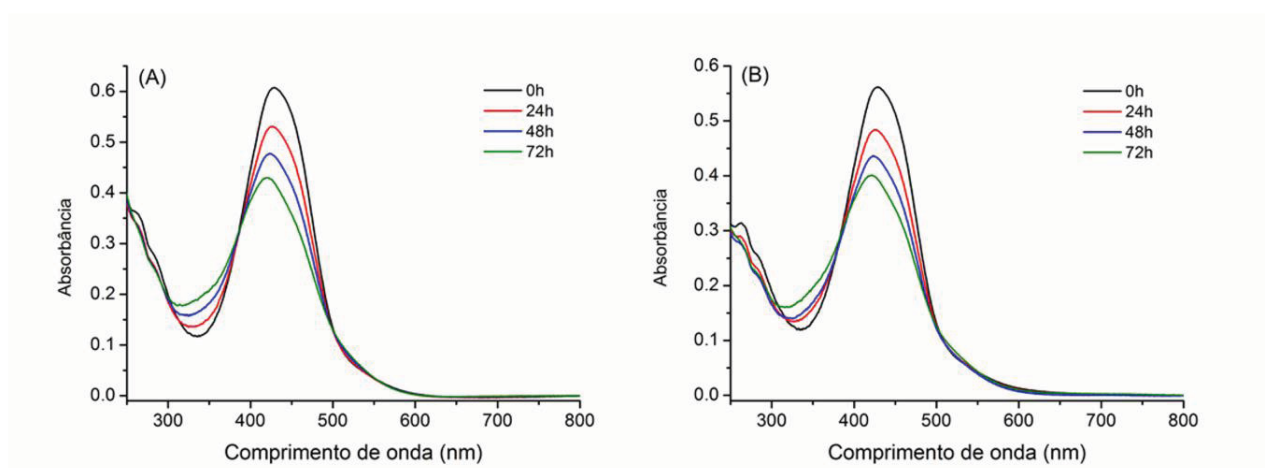


Figura 5.4. Espectros UV-vis do composto **2b** em 1% DMSO e H_2O , em solução de NaCl (A) $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e (B) $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, por 72h.

5.2. Estudo da substituição de ligantes

Após descartar a hipótese da hidrólise da ligação Ru-Cl como a principal reação sofrida pelos complexos de η^6 -arenorutênio(II), foram acompanhados por espectroscopia RMN de ^1H soluções em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ dos compostos catiônicos **2a**, **2b**, **4a** e **4b** por 72h, a fim de investigar as alterações sofridas na espécie de rutênio e produtos formados em solução. A baixa solubilidade dos compostos em D_2O não permitiu que esses ensaios fossem acompanhados nesse solvente.

As figuras 5.5 e 5.6 mostram os espectros de RMN de ^1H obtidos ao longo de 72h para os compostos **2a** e **2b**. O primeiro espectro obtido logo após a dissolução dos compostos contém os conjuntos de sinais correspondentes aos compostos **2a** e **2b**, respectivamente. Após 6h de reação foi observado o surgimento de um sinal em 7.37 ppm (indicado por * nas figuras 5.5 e 5.6), que foi aumentando de intensidade no decorrer das 72h de reação. Esse sinal corresponde ao benzeno livre, que ao final das 72h de reação, essa saída/perda do ligante benzeno correspondeu a 33% (com base nas integrais de pico) para o composto **2a** e 31% para o composto **2b**. Também foi observado o surgimento de novos sinais (identificados por • nas figuras 5.5 e 5.6) atribuídos a metila presente no DMSO coordenado ao centro metálico, onde até três sítios de coordenação originalmente ocupados pelo ligante benzeno podem estar ocupados pelo DMSO. A formação dessa espécie é bem evidenciada no espectro de 72h do composto **2b** (Figura 5.6), com o surgimento do multipeto em $\delta = 3.89$ ppm, que acopla para 6H. No composto **2a** (Figura 5.5) esse sinal aparece em $\delta = 4.10$ ppm, estando encoberto por outro sinal. Devido o grande número de novos sinais, sugerimos que também pode estar ocorrendo à saída do ligante cloreto, mas em menor proporção. Já a saída do ligante azo foi descartada, pois nenhum novo sinal apareceu na região onde seriam observados sinais do ligante livre.

O mesmo foi observado para os compostos **4a** e **4b** (Figuras 5.7 e 5.8), sendo que ao final das 72h de reação a perda do ligante benzeno representou 31% para o composto **4a** e 32% para o composto **4b**, com novas espécies formadas ao final da reação.

Na literatura,¹³⁶ há exemplos de substituição fotoquímica do benzeno em complexos η^6 -arenorutênio(II), mas em condições de baixas temperaturas e solução aquosa essa substituição é incomum. Como a maioria das substituições ocorre na presença de nucleófilos fortes, estas reações ainda são relativamente raras.¹³⁷

A saída observada do ligante benzeno em DMSO pode ser entendida considerando a natureza da ligação η^6 -areno a Ru(II), que é reforçada pela retrodoação π do centro de rutênio. Além disso, os ligantes azopiridina e oxadiazopiridina são fortes π -aceitadores promovendo uma maior estabilidade no complexo de baixo estado de oxidação, Ru (II). Assim o benzeno está ligado menos fortemente ao rutênio devido à competição com a ligação do ligante azo e oxadiazo, devido à densidade de elétrons π . Há então uma competição de *trans*-labilização dos ligantes benzeno e azo/oxadiazo.⁵³

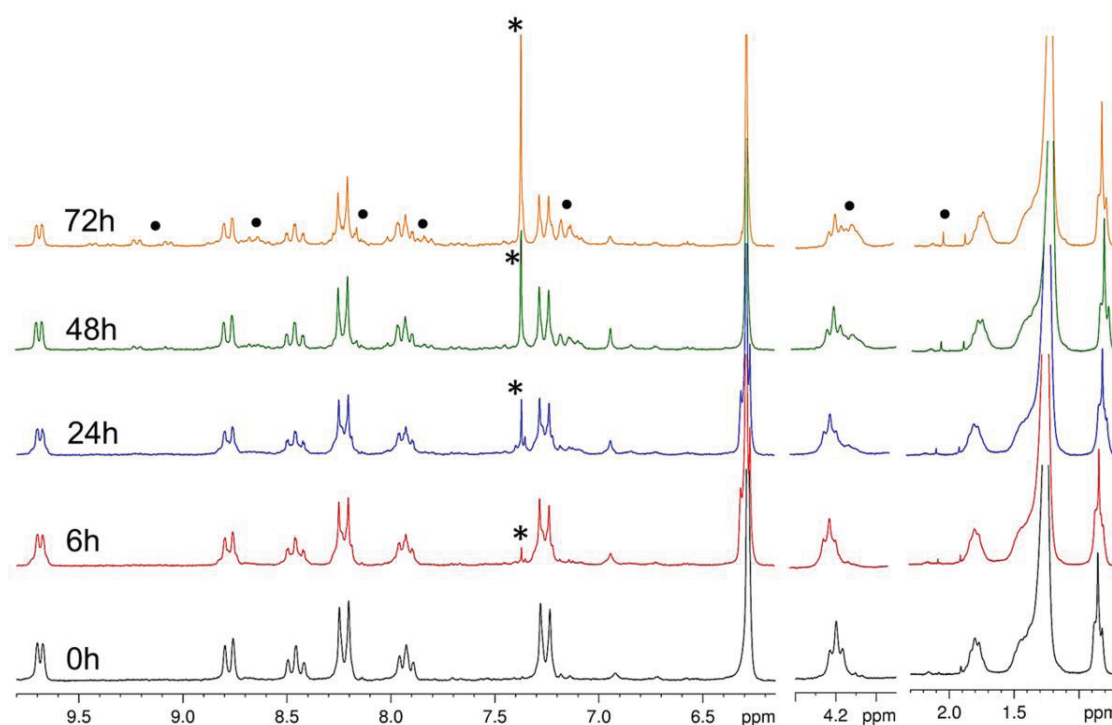


Figura 5.5. Espectro de RMN de ^1H do composto 2a em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ durante 72h. Atribuições dos picos: (*) benzeno livre, (•) picos da nova espécie formada, composto 2a após a solvólise.

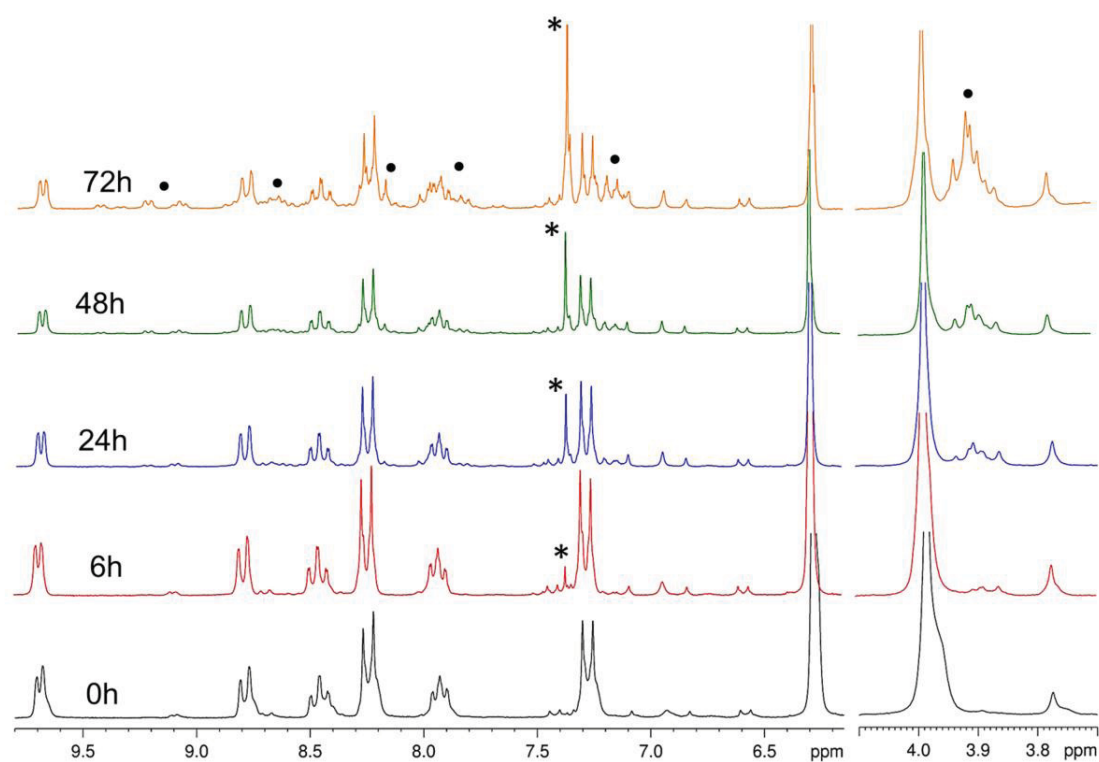


Figura 5.6. Espectro de RMN de ^1H do composto 2b em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ durante 72h. Atribuições dos picos: (*) benzeno livre, (•) picos da nova espécie formada, composto 2b após a solvólise.

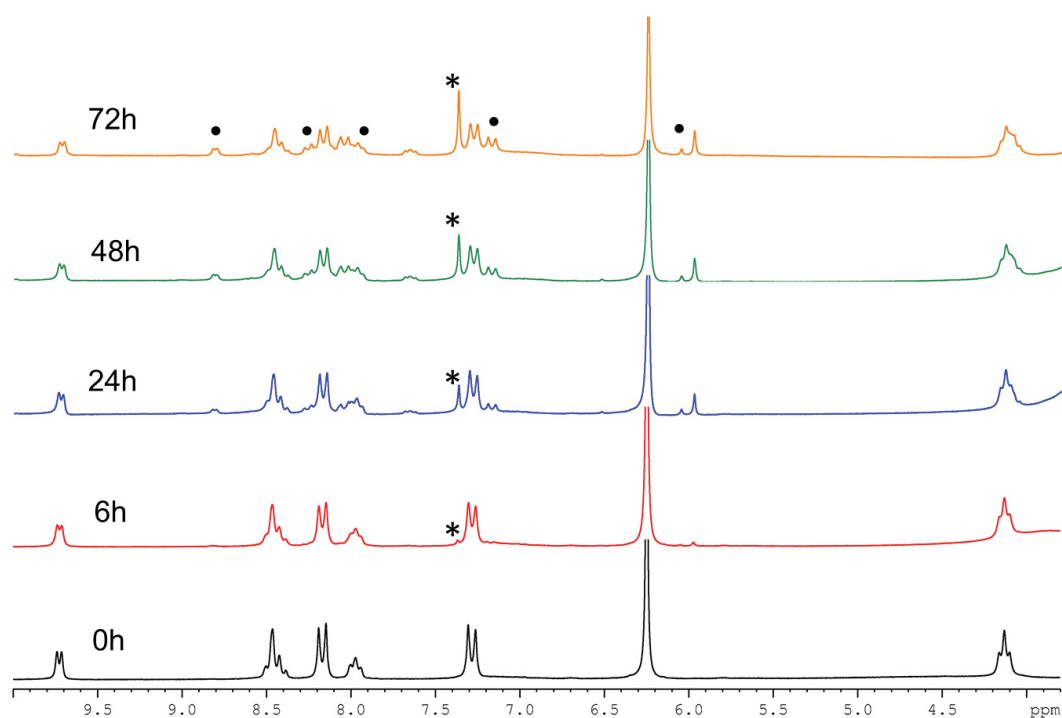


Figura 5.7. Espectro de RMN de ^1H do composto 4a em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ durante 72h. Atribuições dos picos: (*) benzeno livre, (•) picos da nova espécie formada, composto 4a após a solvólise.

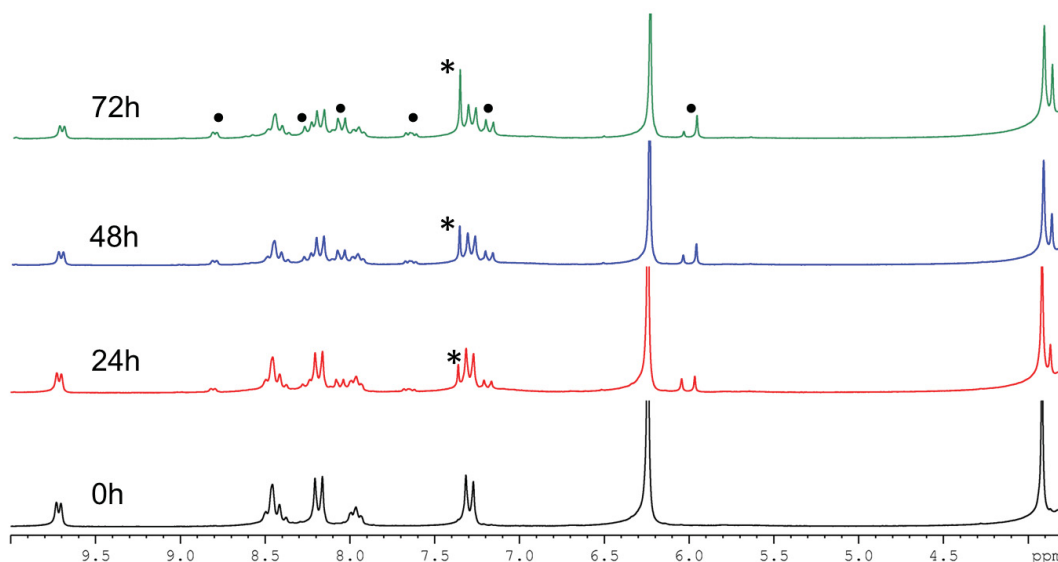


Figura 5.8. Espectro de RMN de ^1H do composto 4b em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ durante 72h. Atribuições dos picos: (*) benzeno livre, (•) picos da nova espécie formada, composto 4b após a solvólise.

O produto esperado após a perda do ligante benzeno é o composto de rutênio solvatado. No entanto, na escala de tempo usada nesse estudo não foi possível detectar a presença de intermediários. Um possível mecanismo para a solvólise (Figura 5.8) envolve um estado de transição, onde a molécula de solvente e o ligante benzeno competem para a ligação ao rutênio. A reação consecutiva consiste em uma liberação rápida do benzeno e a coordenação de mais duas moléculas do solvente.

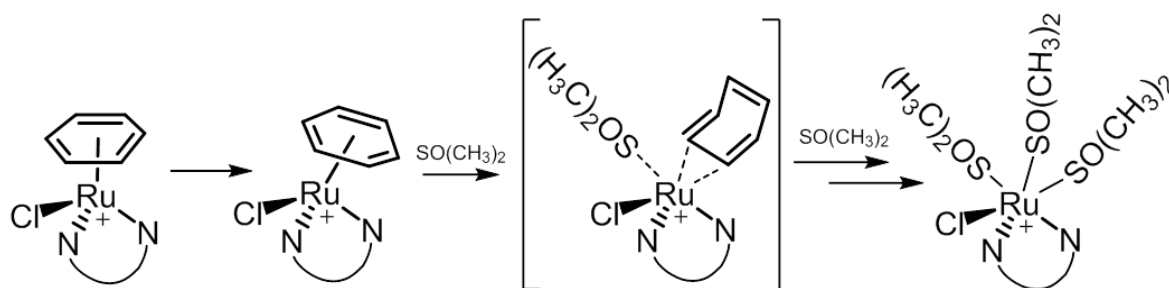


Figura 5.9. Proposta de reação para a solvatação de compostos de η^6 -arenorutênio. Adaptado de Karlen *et al.*¹³⁷

Ao final de cada reação, após 72h, foi realizada espectroscopia UV-vis das amostras. Os espectros (Figura 5.10) apresentaram máximos de absorção em 430nm nos compostos **2a** e **2b**, e em 312nm para os compostos **4a** e **4b**. O perfil dos espectros eletrônicos é muito similar ao observado em solução aquosa (Figura 5.1), indicando que está ocorrendo um processo dinâmico com a reação de hidrólise/solvatação da ligação Ru-Cl e a saída do ligante benzeno, que é a principal causa das mudanças espectrais observadas em todos os experimentos. Vale ressaltar que em solução temos um equilíbrio de diferentes espécies, que no mesmo tempo utilizado para os dos ensaios biológicos (72h) ainda contém aproximadamente 70% dos compostos na forma de η^6 -arenorutênio(II), inicialmente preparados.

Os ligantes azo/oxadiazó também não são substituídos em solução, apesar de que em fase gasosa (espectros de ESI-MS) observamos a substituição do ligante clorido (por acetato) e a saída dos ligantes, evidenciada pelo sinal referente ao ligante livre. Os ligantes quelantes azo/oxadiazó se ligam mais fortemente ao rutênio do que os monodentados e, pelo efeito *trans*-labilizante, provocam a saída mais rápida do benzeno. Isso explica porque os compostos com os ligantes monodentados são mais estáveis em solução.

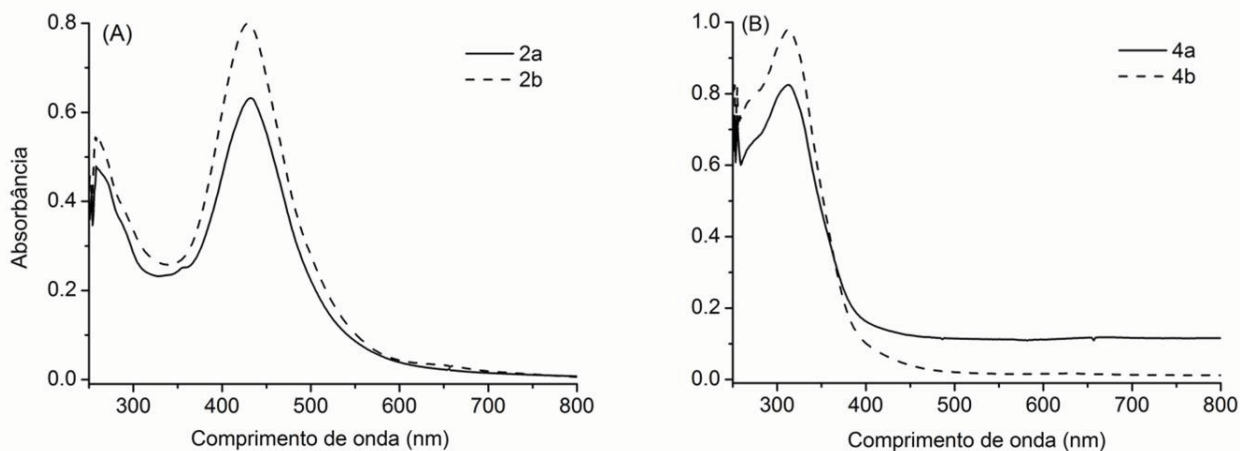


Figura 5.10. Espectro UV-vis em DMSO após 72h de reação, alíquotas da solução utilizada nos espectros de RMN de ^1H .

5.3. Estudo cinético

O estudo cinético dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) foram monitorados por espectroscopia UV-vis em solução aquosa (1% de DMSO e H_2O) à 37°C (temperatura corporal). Para selecionar os comprimentos de onda para o estudo cinético, foi feito um espectro eletrônico das soluções dos compostos onde os máximos de absorção foram observados em 436nm para os compostos **2a** e **2b** e em 320nm para os compostos **4a** e **4b**. Os dados cinéticos resultantes da diminuição da absorbância durante o tempo de 10800 segundos, foram ajustados por computador para a equação 1 por ajuste não-linear (Figura 5.11) e equação 2 para ajuste linear.

Nos compostos catiônicos **2a**, **2b**, **4a** e **4b** a dependência da absorbância em função do tempo se ajustou a equação de primeira ordem, onde os valores das constantes observadas foram da ordem de $1.67\text{-}6.94 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ que estão mostradas na tabela 5.1. O valor da taxa de aquação observada indica uma aquação lenta dos compostos de rutênio. Wang *et al.*¹³⁵ descreveram a cinética dos complexos $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ (en = etilenodiamina, areno = bifenil (Bip), 5,8,9,10-tetra-

hidroantraceno (THA), 9,10-di-hidroantraceno (DHA)), com taxa de aquação de $1.23\text{--}2.26 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ com ordem de grandeza 10x maior do que a observada para nossos compostos **2a**, **2b**, **4a** e **4b**, que foi da ordem de 10^{-4} s^{-1} .

Em complexos monoméricos de cloreto de rutênio(II), *cis*-[Ru(H₂O)₄Cl₂] relatados por Dumas *et al.*¹³⁸ a taxa de aquação é ainda maior, $130 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, indicando que o ligante quelante etilenodiamina em $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ reduziria a labilidade do Cl⁻. O efeito dos ligantes quelantes nas reações de hidrólise depende da natureza do metal e da posição do ligante quelante em relação ao grupo de saída.¹³⁵

Os ligantes quelantes azo/oxadiazó, fortes π -aceitadores tem efeito *trans*-labilizante mais pronunciado, acelerando a substituição do ligante benzeno em posição *trans*, ao contrário do que foi observado com os compostos neutros **1a**, **1b**, **3a** e **3b**. Não foram observadas uma mudança significativa da absorbância em função do tempo, uma vez que os ligantes monodentados azo/oxadiazó são menos π -aceitadores diminuindo seu efeito *trans*-labilizantes e a saída do benzeno não ocorre no tempo de reação estudo.

$$A = (A_0 - A_\infty)e^{-kt} + A_\infty \quad (1)$$

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - kt \quad (2)$$

Tabela 5.1. Constante cinética de primeira ordem da saída do ligante benzeno dos compostos catiônicos de η^6 -arenorutênio(II).

Composto	$k_{obs} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\lambda \text{ (nm)}$
2a	6.94×10^{-4}	436
2b	1.67×10^{-4}	436
4a	1.96×10^{-4}	320
4b	2.11×10^{-4}	320

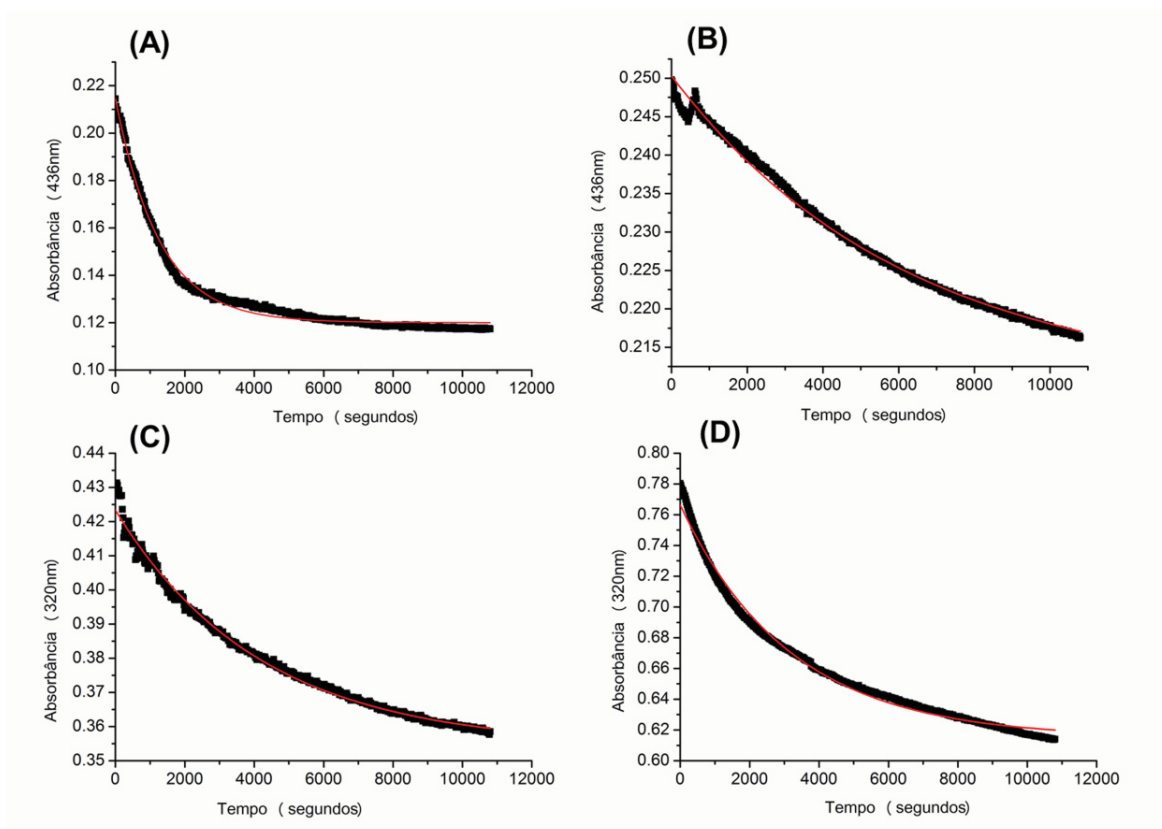


Figura 5.11. Curva cinética resultante da diminuição da absorbância em função do tempo (segundos), ajustadas pela equação $A = (A_0 - A_\infty)e^{-kt} + A_\infty$. Compostos (A) **2a**, (B) **2b**, (C) **4a** e (D) **4b**.

5.3. Conclusões parciais

As reações de substituição em solução revelou a saída do ligante benzeno, que pode ser entendida considerando o forte caráter π -aceitador dos ligantes azo/oxadiazó que competem com a ligação η^6 -areno a Ru(II), que é reforçada pela retrodoação π do centro de rutênio.

O modelo descrito na literatura de formação de um aquocomplexo através da substituição do ligante cloreto, que foi o que observamos em fase gasosa, na espectrometria de massa, não é o principal processo envolvido nos nossos complexos

de η^6 -arenorutênio(II) em solução. No entanto, em solução se tem um equilíbrio de diferentes espécies que no mesmo tempo utilizado para os dos ensaios biológicos (72h) ainda contém aproximadamente 70% dos compostos na forma de η^6 -arenorutênio(II), inicialmente preparados.

Os compostos catiônicos **2a**, **2b**, **4a** e **4b** sofrem reação de solvólise, sendo que a curva cinética se ajustou a uma equação de primeira ordem, com valores das constantes observadas da mesma ordem de grandeza, independente do ligante azo/oxadiazó coordenado.

A cinética ocorre mais facilmente nos compostos catiônicos, com ligantes quelantes, devido o maior efeito *trans*-labilizantes desses ligantes. Já nos compostos neutros com ligantes monodentados, onde o efeito *trans*-labilizante é menos pronunciado, são mais estáveis.

Capítulo 6:

Atividade biológica dos compostos de η^6 -arenorutênio(II)

Capítulo 6 – Atividade biológica dos compostos de η^6 -arenorutênio(II)

Neste capítulo serão abordados os resultados de citotoxicidade dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) em modelo de glioblastoma humano utilizando as linhagens U251, U87MG e T98G, avaliando especificamente se os referidos compostos são capazes de alterar a atividade metabólica das células, modular a capacidade de progressão pelo ciclo celular, promover fragmentação de DNA, bem como alterar a morfologia das células.

6.1. Citotoxicidade celular

O efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio foi avaliado em células tumorais de glioblastoma humano nas linhagens: U251, U87MG e T98G. As células de glioblastoma foram tratadas com os compostos **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4a** e **4b** por 72 horas e a atividade metabólica das células foi avaliada pelo método de MTT.

Os resultados de MTT, representados nas Figuras 6.1, 6.2 e 6.3 e Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3, mostraram que os compostos do grupo I (azo-complexos) exibiram atividade citotóxica em todas as linhagens celulares avaliadas, sendo os compostos **2a** e **2b** os mais citotóxicos. A maioria dos compostos do grupo II (oxadiazó-complexos) apresentaram menor citotoxicidade, com exceção do composto **4a**. Foi observado que o grupo fenilazo desempenha um papel especial na citotoxicidade, dado que o grupo I foram todos citotóxicos para as linhagens celulares de glioblastoma, enquanto que no grupo II apenas o composto **4a** apresentou elevada citotoxicidade. Os compostos mais hidrofóbicos, isto é, os que têm a cadeia C12 tiveram tendência a serem mais citotóxicos do que os compostos que tem um grupo metoxi, com exceção dos

compostos **1a** e **1b** na linhagem celular T98G (Figura 6.1). Provavelmente, o aumento da hidrofobicidade do ligante facilita a permeabilidade celular. Os complexos catiônicos foram mais citotóxicos do que os neutros, como observado para os compostos **2a**, **2b** e **4a**, provavelmente a anfifilicidade aumentada proporcionada pelas espécies carregadas, equilibradas pela cadeia hidrofóbica, facilita a permeabilidade celular destes compostos.

Palmucci *et al.*¹³⁹ descreveram uma série de complexos de acilpirazolonato de η^6 -arenorutênio(II) neutros e catiônicos com grupos alifáticos na porção acil, que exibem citotoxicidade *in vitro* em células de carcinoma de ovário humano. Os complexos catiônicos contendo PTA (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfadadamantano) com uma longa cadeia hidrofóbica foram mais citotóxicos do que os seus precursores neutros, com potencial comparável à da cisplatina para carcinoma de ovário humano.

Entre os compostos do grupo I, percebe-se que todos apresentaram atividade citotóxica: o composto **1a** apresentou citotoxicidade dependente da concentração utilizada em todas as linhagens avaliadas, ou seja, a porcentagem das células metabolicamente ativas diminui com o aumento da concentração do composto (Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3). O composto **1b** apresentou citotoxicidade dependente da concentração somente para as células T98G (Figura 6.1), nas células U87MG (Figura 6.2) apresentou citotoxicidade nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e nas células U251 (Figura 6.3) apresentou citotoxicidade na concentração mais elevada (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Vale destacar que o composto **1b** se mostrou particularmente mais citotóxico para as células T98G, promovendo apenas 2,4 % de células metabolicamente ativas após tratamento com 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabela 6.1), em comparação com 37,8 e 41,8% de células U87MG (Tabela 6.2) e U251 (Tabela 6.3) metabolicamente ativas, respectivamente.

O composto **2a** do grupo I, promoveu citotoxicidade em todas as concentrações utilizadas de todas as linhagens celulares avaliadas (Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3). Outro composto que apresentou alta citotoxicidade foi o **2b**, em todas as linhagens avaliadas, capaz de promover em torno de 5 % de células metabolicamente ativas após tratamento com 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabela 6.1, 6.2 e 6.3).

No grupo II apenas o composto **4a** exibiu alta citotoxicidade. Nas células T98G e células U87MG (Figuras 6.1 e 6.2) o composto **4a** promoveu citotoxicidade dependente da concentração (Tabelas 6.1 e 6.2) e nas U251 (Figura 6.3) o tratamento com o composto **4a** reduziu intensamente a porcentagem de células metabolicamente ativas em todas as concentrações utilizadas em níveis comparáveis ao composto **2a** (Tabela 6.3).

Os demais compostos do grupo II, **3a**, **3b** e **4b** apresentaram menor citotoxicidade nas concentrações utilizadas. Vale destacar que os compostos **3a** e **3b** promoveram menor porcentagem de células metabolicamente ativas após tratamento com a concentração mais elevada ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), conseguindo atingir porcentagens equivalentes que o composto **1a** promoveu após tratamento na concentração de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, em todas as linhagens avaliadas. O composto **4b** não foi citotóxico em altas concentrações para as células T98G (Figura 6.1), mas foi citotóxico nas maiores concentrações para as outras as células U87MG e U251 (Figuras 6.2 e 6.3), promovendo em torno de 40% de células metabolicamente ativas (Tabelas 6.2 e 6.3).

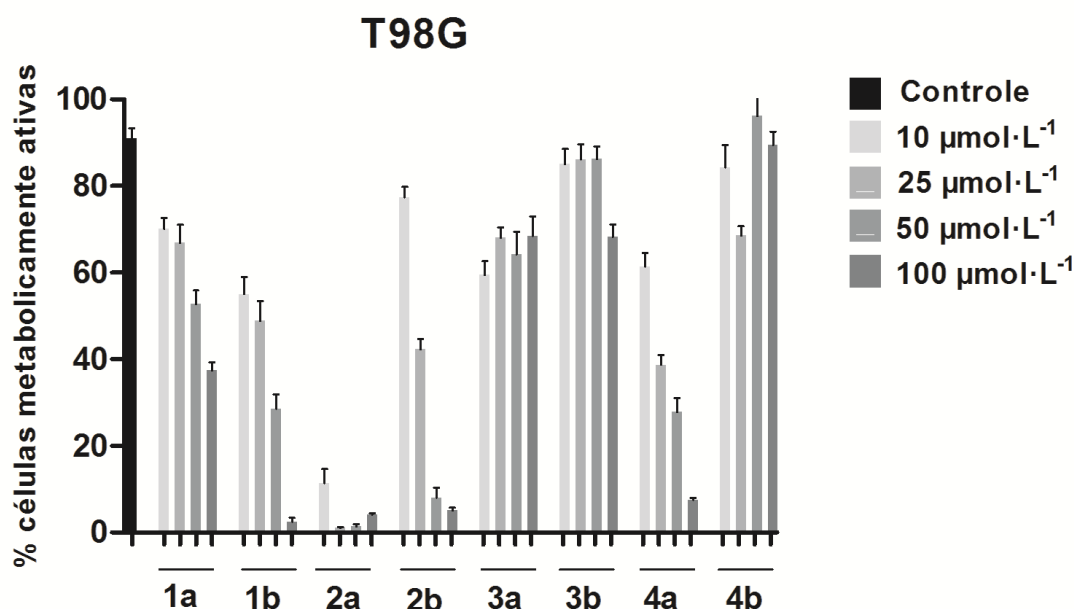


Figura 6.1. Efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) em células T98G.

Nota: A. Ensaio MTT (as condições experimentais são descritas no Capítulo 3 no item 3.7). As células foram tratadas com os compostos de η^6 -arenorutênio(II) com concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 72 horas. Os resultados foram expressos em % células metabolicamente ativas em comparação com o controle (100%) tratado com DMSO. Os dados representam resultados de três experimentos diferentes em quadruplicatas.

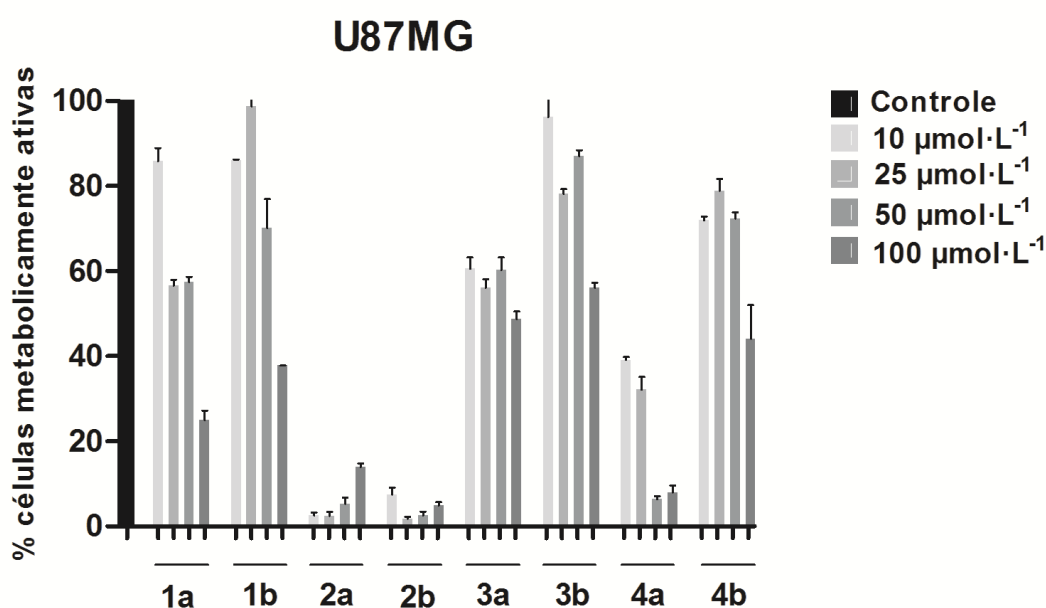


Figura 6.2. Efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) em células U87MG.

Nota: A. Ensaio MTT (as condições experimentais são descritas no Capítulo 3 item 3.7). As células foram tratadas com os compostos de η^6 -arenorutênio(II) com concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 72 horas. Os resultados foram expressos em % células metabolicamente ativas em comparação com o controle (100%) tratado com DMSO. Os dados representam resultados de três experimentos diferentes em quadruplicatas.

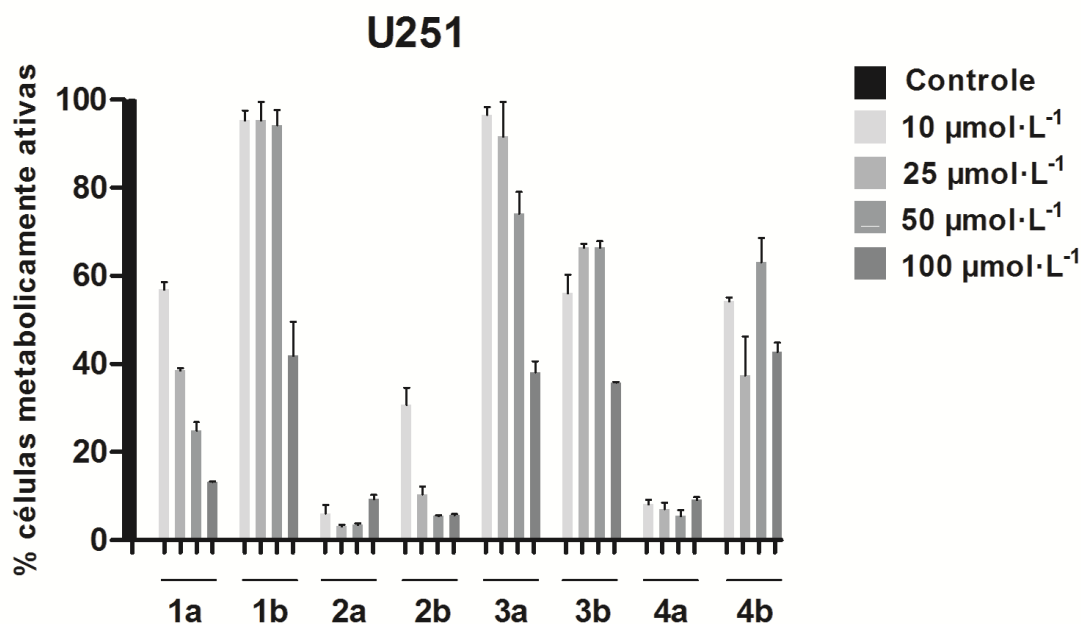


Figura 6.3. Efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) em células U251.

Nota: A. Ensaio MTT (as condições experimentais são descritas no Capítulo 3 item 3.7). As células foram tratadas com os compostos de η^6 -arenorutênio(II) com concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 72 horas. Os resultados foram expressos em % células metabolicamente ativas em comparação com o controle (100%) tratado com DMSO. Os dados representam resultados de três experimentos diferentes em quadruplicatas.

Tabela 6.1. Porcentagem de células metabolicamente ativas T98G em relação ao controle pelo método de MTT

Compostos	% de células metabolicamente ativas em relação ao controle			
	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1a	70,1 \pm 7,7***	66,9 \pm 10,9***	52,7 \pm 8,5***	37,3 \pm 6,1***
1b	55,0 \pm 10,8***	48,8 \pm 12,5***	28,6 \pm 9,7***	2,4 \pm 2,0***
2a	11,3 \pm 4,6***	1,0 \pm 0,7***	1,4 \pm 1,0***	4,1 \pm 0,9***
2b	77,4 \pm 6,3	42,3 \pm 6,3***	8,0 \pm 7,4***	5,0 \pm 2,4***
3a	59,5 \pm 9,1***	68,0 \pm 6,4***	64,2 \pm 13,1***	68,4 \pm 11,3***
3b	85,0 \pm 9,7	86,1 \pm 8,9	86,2 \pm 7,0	68,2 \pm 8,4***
4a	61,4 \pm 9,5***	38,8 \pm 7,0***	27,8 \pm 9,4***	7,5 \pm 1,5***
4b	84,3 \pm 12,8***	68,5 \pm 6,2***	99,4 \pm 12,7	92,5 \pm 8,8

Nota: Os resultados foram expressos como % da viabilidade em comparação com o controle (100%). Os valores representam a média \pm DP em relação ao controle de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Tabela 6.2. Porcentagem de células metabolicamente ativas U87MG em relação ao controle pelo método MTT

Compostos	% de células metabolicamente ativas em relação ao controle			
	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1a	85,9 \pm 4,3	56,6 \pm 1,9***	57,4 \pm 1,7***	25,0 \pm 2,9***
1b	86,1 \pm 0,2	98,8 \pm 7,9	70,1 \pm 9,7***	37,8 \pm 0,06***
2a	2,6 \pm 1,1***	2,5 \pm 1,7***	5,3 \pm 2,5***	13,9 \pm 1,2***
2b	7,5 \pm 2,2***	1,8 \pm 0,8***	2,6 \pm 1,6***	5,0 \pm 1,3***
3a	60,5 \pm 3,8***	56,1 \pm 2,8***	60,3 \pm 4,1***	48,8 \pm 2,5***
3b	96,3 \pm 7,3	78,0 \pm 1,7***	87,0 \pm 2,0	56,1 \pm 1,7***
4a	39,1 \pm 0,9***	32,1 \pm 4,2***	6,4 \pm 1,3***	8,0 \pm 2,3***
4b	71,9 \pm 1,3***	78,8 \pm 3,8***	72,3 \pm 2,2***	44,1 \pm 11,1***

Nota: Os resultados foram expressos como % da viabilidade em comparação com o controle (100%). Os valores representam a média \pm DP em relação ao controle de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Tabela 6.3. Porcentagem de células metabolicamente ativas U251 em relação ao controle pelo método MTT

Compostos	% de células metabolicamente ativas em relação ao controle			
	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1a	56,8 \pm 2,5***	38,6 \pm 0,7***	24,9 \pm 2,7***	13,2 \pm 0,2***
1b	95,3 \pm 14,5	95,2 \pm 14,8	94,2 \pm 1,5	41,8 \pm 7,0***
2a	6,0 \pm 2,7***	3,4 \pm 0,6***	3,4 \pm 0,5***	9,3 \pm 1,7***
2b	30,7 \pm 5,5***	10,4 \pm 2,4***	5,5 \pm 0,2***	5,6 \pm 0,4***
3a	96,5 \pm 14,8***	91,6 \pm 3,6***	74,1 \pm 7,4***	38,0 \pm 2,8***
3b	56,0 \pm 5,9***	66,4 \pm 1,2***	66,3 \pm 2,2***	35,8 \pm 0,2***
4a	8,1 \pm 1,5***	7,0 \pm 2,0***	5,4 \pm 2,0***	9,1 \pm 0,9***
4b	54,2 \pm 1,2***	37,3 \pm 12,6***	63,1 \pm 7,7***	42,8 \pm 2,9***

Nota: Os resultados foram expressos como % da viabilidade em comparação com o controle (100%). Os valores representam a média \pm DP em relação ao controle de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

De acordo com os resultados obtidos que mostram a porcentagem das células metabolicamente ativas após tratamento com os diferentes compostos foi possível calcular os valores de IG_{50} (concentração necessária para inibição de 50% da atividade celular) mostrados na tabela 6.4. Analisando o grupo I, confirmamos que o composto **2a** é o mais citotóxico do grupo para todas as linhagens celulares avaliadas, com valores próximos de IG_{50} (5.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para U251; 4.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para U87MG e 5.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para T98G). Os valores de IG_{50} do composto **2b** também mostrou alta atividade citotóxica para todas as linhagens avaliadas, porém é mais eficiente para as

linhagens U251 ($IG_{50} = 8.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e U87MG ($IG_{50} = 4.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). O composto **1a** apresentou melhor atividade citotóxica para a linhagem U251 ($IG_{50} = 22.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). De maneira interessante, o composto **1b** apresentou um comportamento distinto aos demais compostos, pois apresentou um valor menor de IG_{50} ($31.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para a linhagem T98G, comparado aos valores apresentados para as outras linhagens ($56.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para U251 e $97.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para U87MG) (Tabela 6.4). Kanzawa *et al.*¹⁴⁰ mostraram que a linhagem T98G é resistente ao quimioterápico padrão, a temozolomida, que apresentou um valor de $IG_{50} > 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mesmo após exposição prolongada (72 horas), enquanto que para as linhagens U87MG e U251MG os valores de IG_{50} do quimioterápico Temozolomida são menores que $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Portanto, o composto **1b** apresentou uma atividade biológica bastante interessante para as linhagens de glioblastomas avaliadas, sugerindo que promove citotoxicidade também em uma linhagem altamente resistente ao quimioterápico padrão.

Na literatura há relatos de compostos análogos altamente citotóxicos para outros modelos de carcinoma, como os complexos avaliados por Romero-Canelón *et al.*¹⁴¹ $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})(\text{azo/imino-piridina})\text{X}]^+$ em que $\text{X} = \text{Cl}$ ou I , que exibiram uma potente atividade citotóxica ($IG_{50} < 17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), com exposição de 24 horas, em linhagens de carcinoma de ovário, pulmão, cólon e de mama. Isso mostra que compostos de η^6 -arenorutênio(II) possuem atividade citotóxica para diferentes tipos de tumores.

Os compostos **3a**, **3b** e **4b** apresentaram valores de $IG_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ou seja, apresentam baixa citotoxicidade *in vitro* em comparação com os compostos do grupo I para as células de glioblastoma avaliadas. Vale destacar que apesar de não apresentarem elevada citotoxicidade, esses compostos podem ser explorados futuramente como agentes antimetastáticos, como o RAPTA-C que não apresentou citotoxicidade *in vitro*, mas inibiu metástase pulmonar *in vivo*.¹⁷

O composto **4a**, o mais citotóxico do grupo II, apresentou valores de IG_{50} equivalentes ao do composto **2a** (o mais citotóxico do grupo I), para as células U87MG e U251.

Tabela 6.4. Citotoxicidade dos compostos de arenorutênio(II) em linhagens celulares de glioblastoma humano U251, U87MG e T98G.

Composto	IG_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	U251	U87MG	T98G
Grupo I			
1a	22.0 ± 1.3	55.4 ± 8.0	71.9 ± 6.8
1b	56.0 ± 7.1	97.0 ± 1.7	31.0 ± 3.7
2a	5.9 ± 1.0	4.9 ± 0.9	5.5 ± 0.7
2b	8.0 ± 0.5	4.9 ± 1.0	24.7 ± 2.2
Grupo II			
3a	> 100	> 100	> 100
3b	> 100	> 100	> 100
4a	6.1 ± 1.5	5.6 ± 1.7	12.4 ± 3.4
4b	> 100	> 100	> 100

Nota: Os valores de IG_{50} para a citotoxicidade dos compostos foram determinados a 10, 25, 50 e $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, após 72 horas de tratamento pelo método de sobrevivência de células MTT. Abreviaturas: IG_{50} , concentração necessária para inibição de 50% da atividade celular; MTT, brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

As imagens obtidas por microscopia ótica evidenciam a morfologia das células após tratamento de 72h com os compostos de η^6 -arenorutênio são apresentadas nas figuras 6.4 e 6.5. Na primeira coluna temos a imagem das células na condição controle (tratadas apenas com o veículo utilizado - 0,1% de DMSO) e as colunas seguintes seguem a ordem crescente de concentração dos compostos. No controle temos as células com morfologia afilada, aderidas ao substrato, condição que foi considerada

como 100% de células metabolicamente ativas. As células tratadas com o composto **1a** apresentaram alteração morfológica e diminuição da quantidade de células com o aumento da concentração do composto nas linhagens U87MG (Figura 6.4) e U251 (Figura 6.6). Quando as células foram tratadas com o composto **1b** foram observadas alterações na morfologia das células tratadas com 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para forma esférica, sugerindo diminuição da porcentagem de células viáveis nessas condições de tratamento das linhagens U87MG (Figura 6.4) e U251 (Figura 6.6).

Em concordância com os resultados descritos anteriormente, que mostram a elevada citotoxicidade dos compostos **2a**, **2b** e **4a** em células de glioblastoma humano, observamos uma drástica mudança morfológica nas células tratadas com os referidos compostos. Após tratamento com a concentração de 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dos compostos **2a** e **4a** foram observadas mudanças morfológicas nas células U87MG (Figura 6.4 e 6.5) e U251 (Figura 6.6 e 6.7), adquirindo uma morfologia esférica, apresentando baixa adesão ao substrato, nessa mesma concentração do composto **2b** foi observado apenas diminuição na porcentagem das células U87MG e U251. As células U87MG e U251 tratadas com os compostos **2a**, **2b** e **4a** nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentaram grande número de células com morfologia esférica, um indício de diminuição de células viáveis, sugestivo de morte celular.

Por outro lado, as células U87MG (Figura 6.5) e U251 (Figura 6.7) tratadas com os compostos **3a**, **3b** e **4b** não apresentaram mudanças na morfologia evidentes. Apenas nas concentrações mais altas dos compostos **3a** e **3b** na linhagem U87MG apresentou uma pequena diminuição na porcentagem das células.

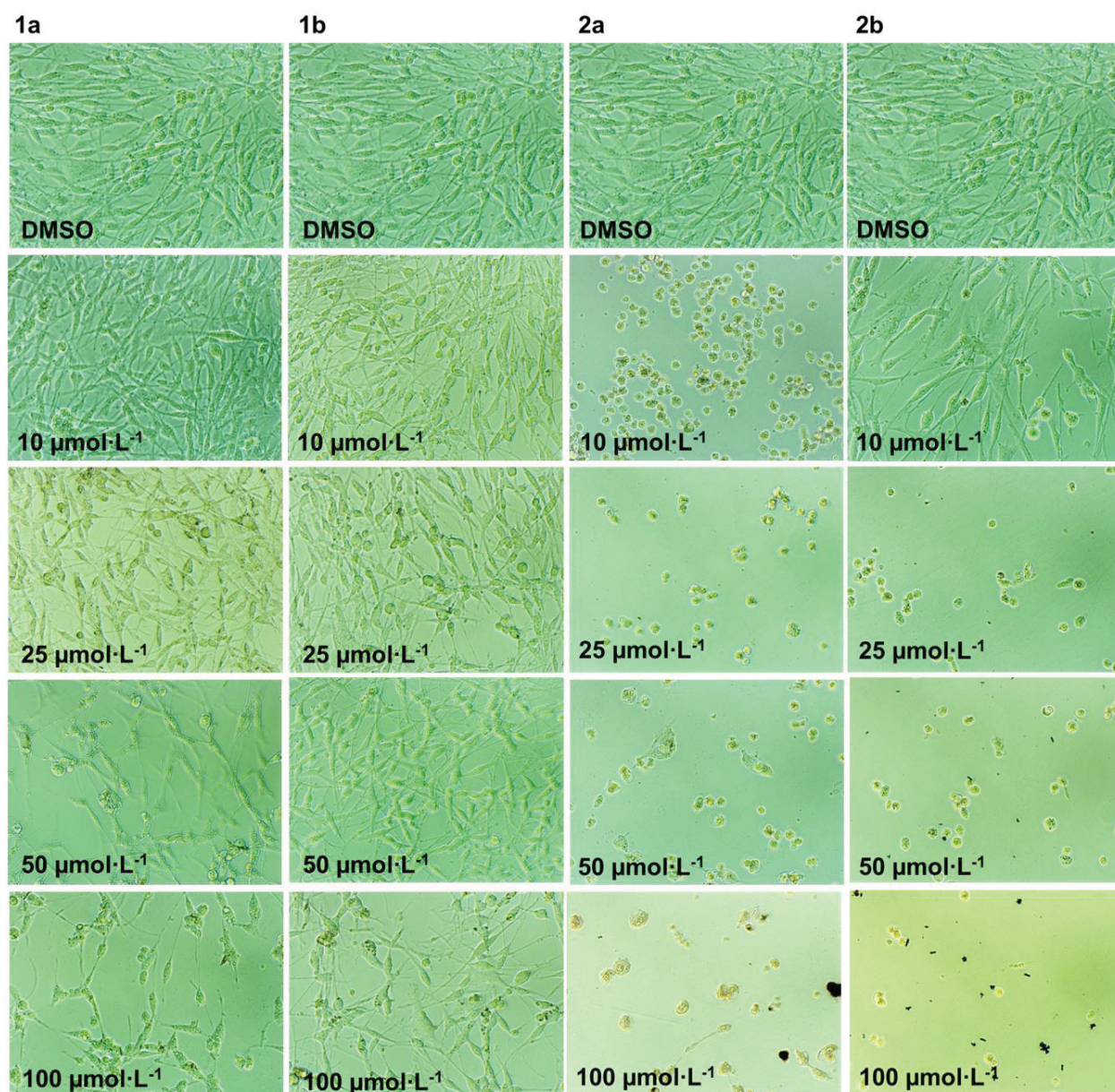


Figura 6.4. Microscopia ótica das células U87MG sob o efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo I: **1a**, **1b**, **2a** e **2b**. Nota: Análise morfológica de células U87MG foi realizada com a incubação e exposição das células aos compostos de η^6 -arenorutênio(II) por 72 horas. Análise foi realizada em microscópio óptico em escala de 50 μm . Controles com DMSO não apresentaram diferenças.

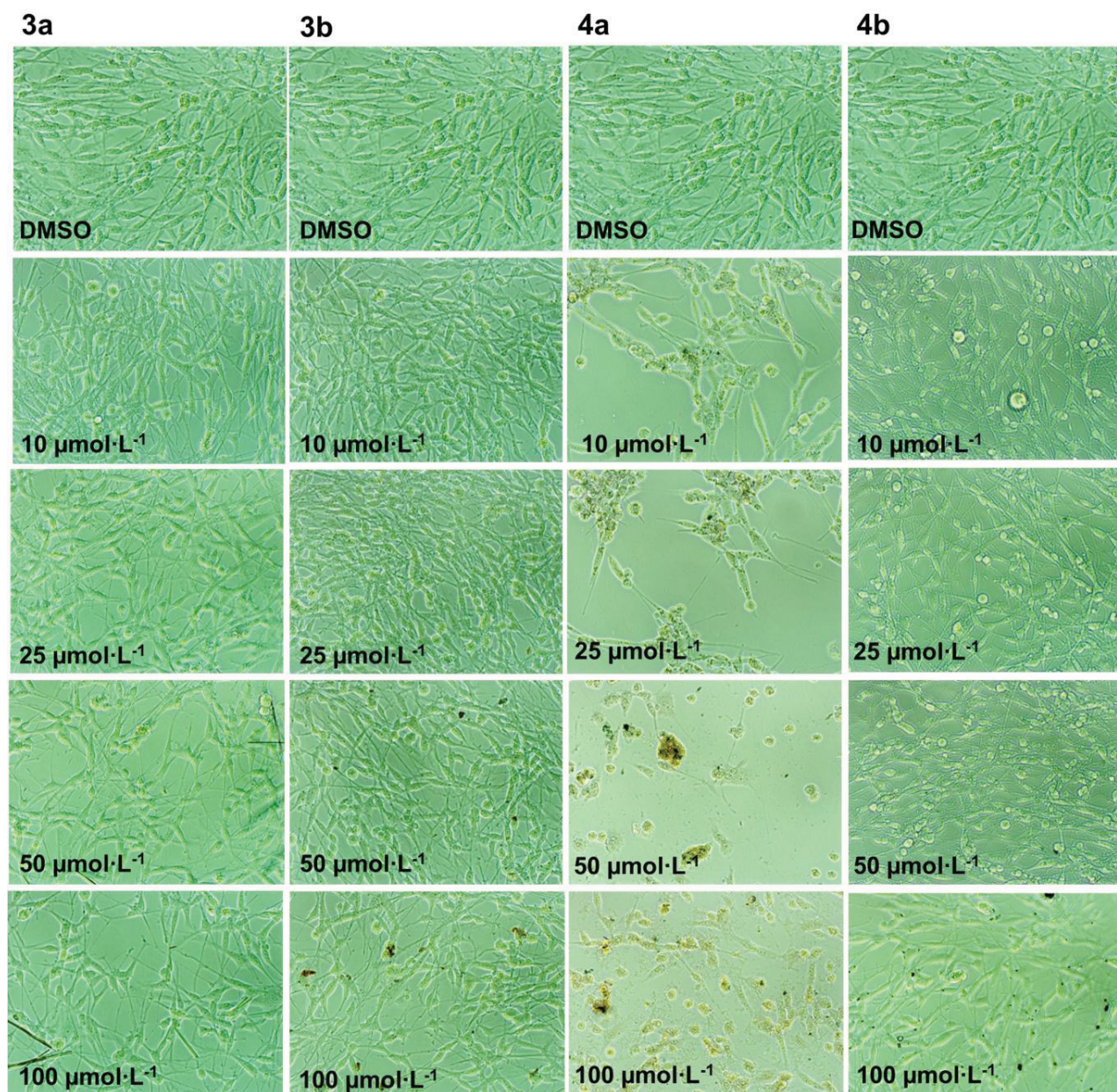


Figura 6.5. Microscopia ótica das células U87MG sob o efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo II: **3a**, **3b**, **4a** e **4b**. Nota: Análise morfológica de células U87MG foi realizada com a incubação e exposição das células aos compostos de η^6 -arenorutênio(II) por 72 horas. Análise foi realizada em microscópio óptico em escala de 50 μm . Controles com DMSO não apresentaram diferenças.

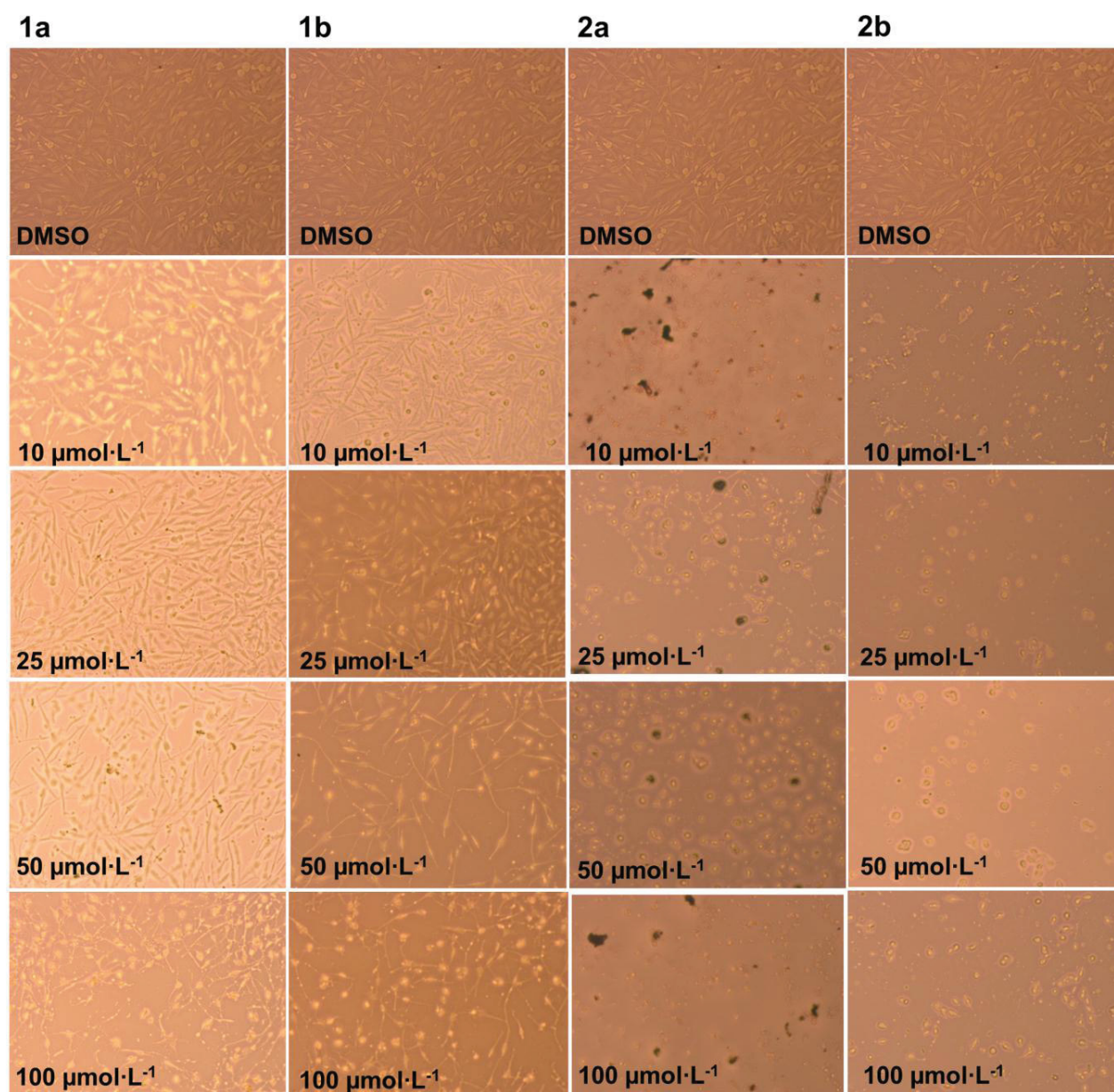


Figura 6.6. Microscopia ótica das células U251 sob o efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo I: **1a**, **1b**, **2a** e **2b**. Nota: Análise morfológica de células U251 foi realizada com a incubação e exposição das células aos compostos de η^6 -arenorutênio(II) por 72 horas. Análise foi realizada em microscópio óptico em escala de 50 μm . Controles com DMSO não apresentaram diferenças.

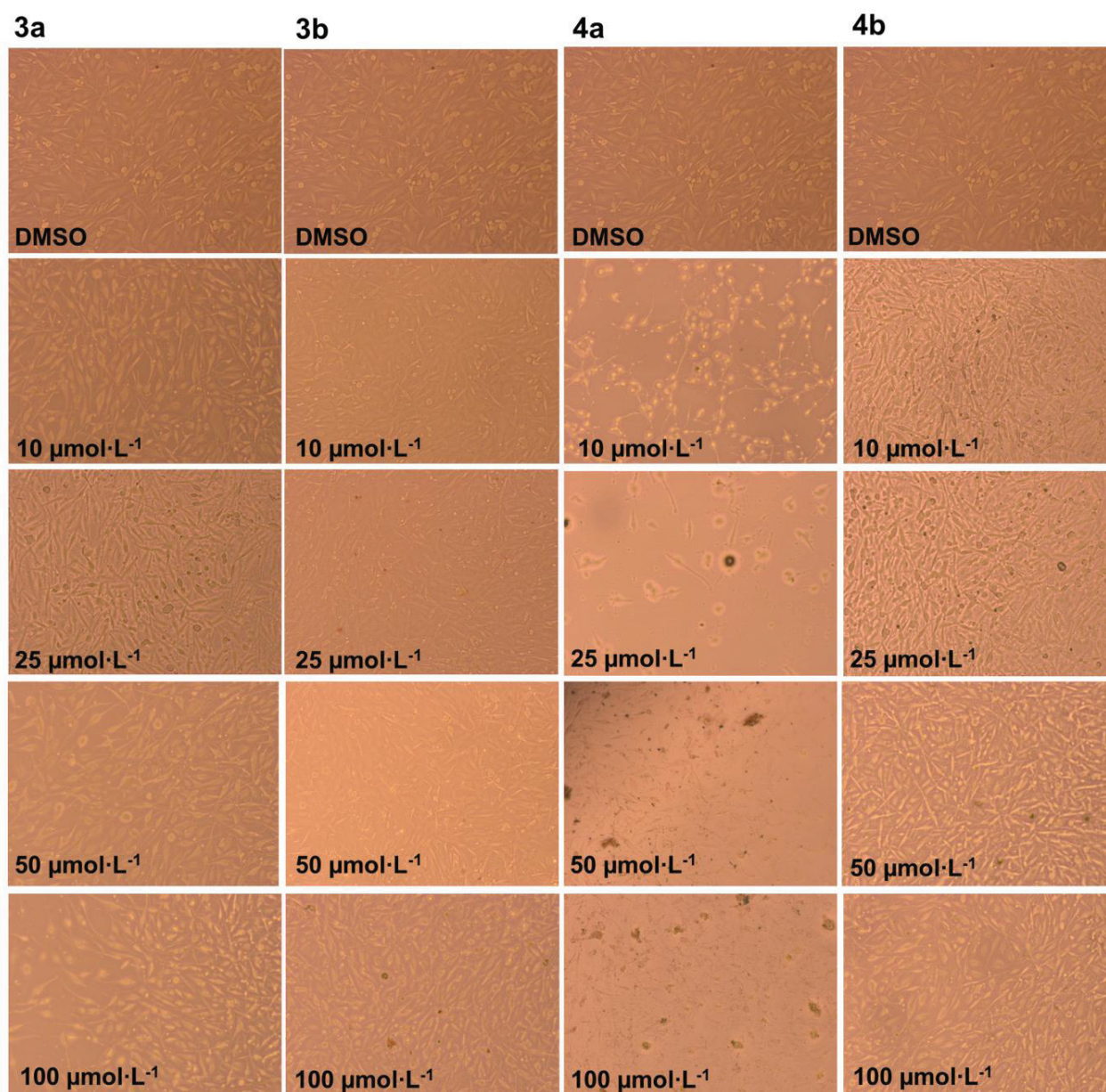


Figura 6.7. Microscopia ótica das células U251 sob o efeito citotóxico dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) do grupo II: **3a**, **3b**, **4a** e **4b**. Nota: Análise morfológica de células U251 foi realizada com a incubação e exposição das células aos compostos de η^6 -arenorutênio(II) por 72 horas. Análise foi realizada em microscópio óptico em escala de 50 μm . Controles com DMSO não apresentaram diferenças.

Os compostos **2a**, **2b** e **4a** que apresentaram maiores atividades citotóxicas nas linhagens de glioblastomas foram os que sofreram solvólise pela perda do ligante benzeno, como mostrado no capítulo 5. No entanto, o composto **4b** também sofre solvólise com constante cinética da mesma ordem de grandeza, mas diferente dos outros compostos esse não apresentou elevada citotoxicidade e não promoveu alterações morfológicas evidentes nas linhagens de glioblastoma estudadas. Vale destacar que para a linhagem T98G o composto **4b** não foi citotóxico nas maiores concentrações utilizadas de 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. De acordo com resultados apresentados no capítulo 5, a porcentagem de benzeno livre é de aproximadamente 30% da concentração inicial do composto, cerca de 0,6 mg. O valor tóxico para ratos é $\text{DL}_{50} = 930 \text{ mg/kg}$. De qualquer maneira, a perda do ligante benzeno pelo composto **4b** não inferiu elevada citotoxicidade as células avaliadas.

Deste modo, nós evidenciamos que o mecanismo de ação dos complexos de η^6 -arenorutênio(II) estudados não deve está relacionada com a solvólise. De fato, existem relatos na literatura^{51, 52} de complexos de η^6 -arenorutênio(II) com atividade citotóxica sem a ocorrência de hidrólise, como os reportados por Dougan *et al.*⁵² [$(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{azpy})\text{I}]^+$ (onde areno = *p*-cimeno ou bifenil e azpy = N, N-dimetilfenil- ou hidroxifenil-azopiridina) que apresentaram citotoxicidade em linhagens celulares de câncer de pulmão e de ovário, através do aumento das espécies reativas de oxigênio, assim o mecanismo de ação desses complexos parece envolver a perturbação do equilíbrio redox nas células tumorais.

Martínez-Alonso *et al.*¹³³ reportou complexos de η^6 -arenorutênio(II), [$(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}(\kappa^2\text{-N,N-HL})$] (onde areno = benzeno ou *p*-cimeno, HL= 2-piridin-2-il-1H-benzimidazol) com taxa de aquação da ordem de 10^4 , apresentando atividade antiproliferativa para as linhagens de ovário ($\text{IG}_{50} < 96 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e de mama ($\text{IG}_{50} < 110 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em exposição prolongada (96 horas). O mecanismo de ação investigado pelos autores envolve a ligação dos compostos no resíduo N7 da base nitrogenada guanina. A ocorrência ou não da formação de aquocomplexos de η^6 -arenorutênio(II) não está diretamente relacionado com o fato de possuírem atividade biológica.

6.2. Análise do ciclo celular e DNA fragmentado nas células T98G

O processo de ciclo celular é dividido em quatro fases sequenciais que podem ser observadas na figura 6.8. Na fase S ocorre a duplicação do DNA, na fase M a célula sofre divisão em duas células filhas (processo também conhecido como mitose) e as outras duas fases (gaps), G1 e G2, são responsáveis pela conexão das fases S e M. A fase G1 começa depois da fase M (divisão celular) e é a fase onde a célula responde a sinais de crescimento, tanto positivos, quanto negativos. Essa fase também é caracterizada pela transcrição gênica e tradução de várias proteínas necessárias para a síntese de DNA. A fase G2 começa após a fase S, tendo como objetivo checar se o DNA foi duplicado corretamente e preparar a célula para a mitose.¹⁴² A etapa G0, também conhecida como estágio quiescente, é uma condição onde o ciclo se encontra parado, de forma a promover condições efetivas para proliferação celular. Se as condições forem satisfeitas, a célula é estimulada a re-entrada no ciclo, na fase G1, continuando a progressão do ciclo celular.¹⁴³

Cada fase do ciclo celular e transição de uma fase para outra dentro do ciclo celular é regulada por diferentes pontos de checagem (*checkpoints*), que são responsáveis pela progressão ou parada do ciclo celular. Na figura 6.8 são mostrados alguns pontos de controle do ciclo (*checkpoints*). O ponto de checagem localizado no final da fase G1 (ponto de restrição R) verifica os sinais de crescimento e promove o bloqueio da progressão do ciclo celular até que um eventual dano no DNA seja reparado, para só então prosseguir o ciclo celular para a fase de replicação (fase S).¹⁴⁴ O ponto de checagem no final da fase G2 monitora a replicação do DNA e representa um sensor importante para danos no DNA. O próximo ponto de checagem ocorre na fase M, que verifica o processo mitótico.¹⁴²

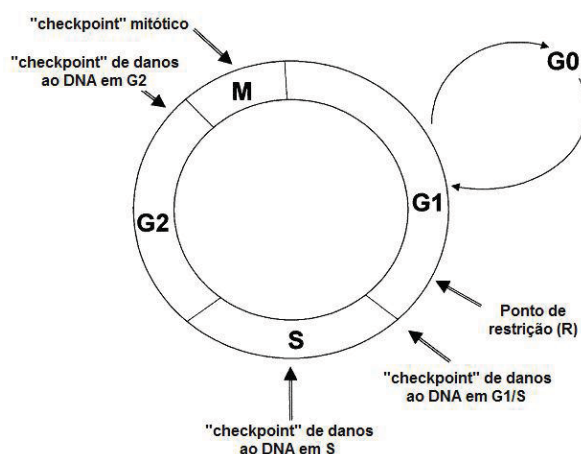


Figura 6.8. Fases do ciclo celular e checkpoints. Adaptado de Garret *et al.*¹⁴²

Para avaliar se os efeitos dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) provocam alterações na progressão do ciclo celular, realizamos ensaio de coloração com iodeto de propídio, um intercalante de DNA fluorescente, seguido de análise por citometria de fluxo em células T98G (Figura 6.9).

A linhagem celular T98G tratada com os compostos **2a** e **2b** na concentração de $25\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mostra uma redução significativa na percentagem de células na fase G0/G1 com aumento concomitante na fase G2/M, enquanto não foi detectada qualquer alteração na progressão do ciclo celular para o tratamento com os outros compostos (Figura 6.9A). Estas alterações da progressão do ciclo celular foram intensificadas quando o tratamento com os compostos **2a** e **2b** foi realizado na maior concentração, à $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 6.9B). Nessa maior concentração, os compostos **1a**, **1b** e **4a** também provocam a redução da percentagem de células na fase G0/G1 do ciclo celular.

O fármaco padrão no tratamento de gliomas malignos, a temozolomida, induz alteração na progressão do ciclo celular de células T98G (concentração de $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ exposta por 72 horas), com aumento da fase G2/M e concomitante diminuição das fases G1 e S.¹⁴⁰

Ainda, os compostos foram avaliados quanto a capacidade de induzir fragmentação de DNA. A Figura 6.10 ilustra o conteúdo de DNA fragmentado de células T98G após o tratamento com compostos de η^6 -arenorutênio(II), o composto **2a**

promoveu aumento do conteúdo de DNA fragmentado já na menor concentração utilizada ($25\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Na concentração mais elevada ($100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) os compostos **1a**, **1b**, **2a**, **2b** e **4a** também promoveram um aumento significativo da porcentagem de células com DNA fragmentado.

Os compostos que promoveram alteração no ciclo celular, **1a**, **1b**, **2a**, **2b** e **4a** foram os que apresentaram elevada capacidade de reduzir a porcentagem de células metabolicamente ativas (Figura 6.1, 6.2 e 6.3). Ainda, esses compostos foram capazes de induzir uma maior porcentagem de DNA fragmentado nas células de glioblastoma, corroborando os dados de citotoxicidade e sugerindo que os compostos de η^6 -arenorutênio(II) são capazes de induzir morte por apoptose.

Em conjunto, os resultados mostraram que os compostos de η^6 -arenorutênio(II) contendo o ligante fenilazo (grupo I) foram capazes de alterar a progressão do ciclo celular com o aumento concomitante na proporção de células hipodiplóides, uma marca registrada do estágio tardio da apoptose, mas que ainda precisa ser confirmado. Estas alterações também foram observadas para o composto **4a**, o único composto com elevada citotóxicidade contendo o ligante feniloxadíazo (grupo II).

Romero-Canelón *et al.*¹⁴⁵ relataram complexos do tipo $[\text{M}(\text{p-cymeno})(\text{azo/imino-piridina})\text{X}]^+$ onde $\text{M} = \text{Ru}^{\text{II}}$ ou Os^{II} e $\text{X} = \text{Cl}$ ou I , onde esses alteraram a progressão do ciclo celular de células de ovário, com aumento na porcentagem de células na fase G1. Vale destacar que a cisplatina altera a progressão do ciclo celular com aumento da porcentagem de células na fase S e G2/M com concomitante redução da fase G1.

Wu *et al.*¹⁴⁶ demonstraram a inibição do crescimento de células de sarcoma osteogênico (tumor ósseo maligno primário) pelo composto $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{p-NMe}_2\text{C}_6\text{H}_4)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A exposição das células a $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do complexo por 24 horas desencadeou um aumento significativo das células em fase S, acompanhado pela diminuição de células em fase G2/M. Apresentou ainda, diminuição nos níveis de expressão da ciclina A, que formam complexos com proteínas quinases para regular a progressão do ciclo celular. Logo, a alteração na progressão do ciclo celular na fase S e a redução da ciclina A é o principal mecanismo de morte celular induzida pelo complexo estudado pelos autores.

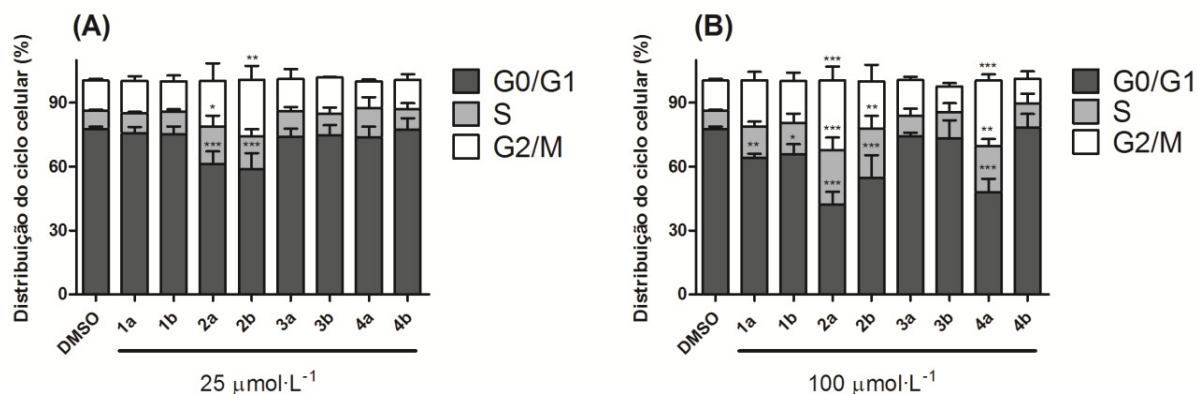


Figura 6.9. Efeito de compostos de η^6 -arenorutênio(II) sobre a progressão do ciclo celular em células de glioblastoma T98G (as condições experimentais são descritas no Capítulo 3 no item 3.9). Nota: As células T98G foram tratadas com diferentes complexos de η^6 -arenorutênio(II) em (A) 25 e (B) 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 72 horas. O DNA celular foi corado com solução de iodeto de propídio e a análise de citometria de fluxo foi realizada para analisar a distribuição do ciclo celular. A figura é representativa de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. *** $p < 0,001$.

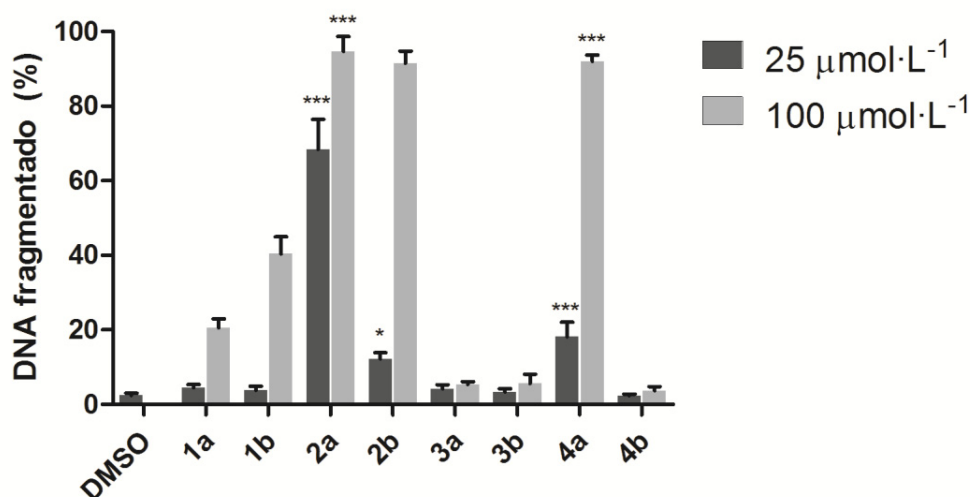


Figura 6.10. Porcentagem de células hipodiplóides, DNA fragmentado, em células T98G. Nota: As células T98G foram tratadas com diferentes complexos de arenorutênio em (A) 25 e (B) 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 72 horas. O DNA celular foi corado com solução

de iodeto de propídio e a análise de citometria de fluxo foi realizada para analisar a distribuição do ciclo celular. A figura é representativa de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. *** $p < 0,001$.

6.3. Conclusões parciais

Os compostos de η^6 -arenorutênio do grupo I (**1a**, **1b**, **2a** e **2b**) foram todos citotóxicos para todas as linhagens celulares de glioblastoma avaliadas, enquanto que somente o composto **4a** do grupo II apresentou citotoxicidade significativa. Os resultados mostraram que os compostos mais hidrofóbicos contendo ligantes de cadeia longa foram mais citotóxicos que os compostos que possuem um grupo metoxi e os compostos catiônicos foram mais citotóxicos do que os neutros. Além disso, os resultados da porcentagem de células metabolicamente ativas corroboram as imagens de microscopia ótica das células, mostrando mudanças na morfologia das células quando o composto é altamente citotóxico.

O composto **2a** apresentou valores próximos de IG_{50} para todas as linhagens avaliadas, já os compostos **1a**, **2b** e **4a** apresentaram valores de IG_{50} mais altos para a linhagem T98G, mostrando que essa linhagem é mais resistente a esses compostos. Entretanto, o composto **1b** apresentou um comportamento distinto aos demais compostos, pois apresentou um menor valor de $IG_{50} = 31.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, para a linhagem celular T98G. Portanto, a atividade biológica desse composto é bastante interessante para as linhagens de glioblastomas avaliadas, uma vez que promovendo citotoxicidade na linhagem T98G que é resistente à ação do quimioterápico padrão.

A citotoxicidade dos compostos foi atribuída, pelo menos em parte, a alterações da progressão do ciclo celular e aumento do conteúdo de DNA fragmentado, sugerindo um mecanismo apoptótico.

Capítulo 7:

Proteínas transportadoras de múltiplas drogas da família ABC

Capítulo 7 – Proteínas transportadoras de múltiplas drogas da família ABC

Um dos principais obstáculos no uso de quimioterápicos para o tratamento de diferentes tumores é resistência ao tratamento por diferentes drogas. Alguns mecanismos celulares estão associados à quimiorresistência, incluindo o aumento da expressão dos transportadores ABC, que confere resistência a múltiplos fármacos por meio do efluxo de fármacos antitumorais a partir da célula, diminuindo os seus efeitos terapêuticos. Os transportadores P-gp, MRP1 e ABCG2 estão envolvidos diretamente na resistência a quimioterapia e apresentam uma forte relevância clínica, pois estão superexpressos em vários tipos de tumores, como leucemias, câncer de mama, câncer do sistema nervoso central, entre outros, acarretando em um mau prognóstico dos pacientes portadores desses tumores.

Neste capítulo serão abordado o estudo dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) em células que superexpressam transportadores ABC tais como Pgp, MRP1 e ABCG2. Esse estudo visou avaliar se esses compostos são substratos e/ou se tem ação inibidora nas proteínas transportadoras. Esses experimentos foram realizados no Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) em Lyon, França, sob a supervisão do Dr. Attilio Di Pietro.

7.1. Capacidade de efluxo por proteínas transportadoras de múltiplas drogas da família ABC

Analisamos se os compostos η^6 -arenorutênio(II) são transportados pelas proteínas transportadoras superexpressas nas linhagens celulares NHI3T3-P-gp, BHK21-MRP1 e HEK293-ABCG2 (linhagens resistentes) comparando com linhagens parentais, ou seja, sem a superexpressão do transportador, NHI3T3, BHK21 e HEK293, através do método de MTT.

Inicialmente analisamos a citotoxicidade de todos os compostos η^6 -arenorutênio(II) nas linhagens parentais e resistentes, descritas anteriormente.

Essencialmente, os compostos que são transportados promovem IG_{50} mais elevado para células que superexpressam os transportadores ABC em comparação com as linhagens celulares parentais, pois se efluxados pelos transportadores, o acúmulo intracelular do composto diminui. Assim, é necessário uma maior concentração do composto para inibir 50% da atividade celular.

No grupo I apenas o composto **2b** apresentou maior citotoxicidade para as células parentais (NIH3T3, HEK293 e BHK21), ou seja, os valores de IG_{50} para as células resistentes são maiores que para as células parentais, revelando que esse composto **2b** foi transportado pelas proteínas P-gp, ABCG2 e MRP1(Tabela 7.1). Vale destacar que para a linhagem resistente que superexpressa o transportador P-gp (linhagem NIH 3T3 – P-gp) o composto **2b** apresentou IG_{50} maior que $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os demais compostos do grupo I não foram substratos para nenhuma das proteínas avaliadas.

No grupo II o composto **4a** apresentou maior citotoxicidade para a célula parental NIH3T3, logo os valores de IG_{50} para as células resistentes que superexpressa P-gp é maior que da célula parental, mostrando que o composto **4a** foi substrato para essa proteína. Os demais compostos do grupo II não foram substratos para nenhuma das proteínas avaliadas. Vale destacar que o composto **3b** foi citotóxico apenas para a linhagem resistente que superexpressa o transportador MRP1.

Tabela 7.1. Citotoxicidade dos compostos de arenorutênio (II) frente as linhagens celulares NIH3T3, HEK293 e BHK21.

Compostos	IG ₅₀ (μmol·L ⁻¹)					
	NIH 3T3	NIH 3T3- <i>Pgp</i>	HEK293	HEK293- <i>ABCG2</i>	BHK21	BHK21- <i>MRP1</i>
Grupo I						
1a	57,13 ± 1,25	64,82 ± 1,93	91,5 ± 9,19	85 ± 5,65	43,13 ± 3,83	20,20 ± 1,96
1b	51,27 ± 3,08	59,41 ± 4,44	43,66 ± 3,51	38,0 ± 5,29	30,67 ± 3,21	28,5 ± 5,06
2a	13,26 ± 1,13	16,44 ± 0,70	13,47 ± 0,45	13,30 ± 0,28	2,25 ± 0,27	0,80 ± 0,14
2b	11,61 ± 0,11	> 100	8,63 ± 0,48	16,10 ± 0,95	2,76 ± 0,49	4,36 ± 1,04
Grupo II						
3a	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
3b	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	53,56 ± 6,83
4a	34,45 ± 0,54	65,06 ± 1,75	17,7 ± 2,00	8,55 ± 2,04	2,00 ± 0,34	1,85 ± 0,22
4b	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

Nota: Os valores de IG₅₀ para a citotoxicidade dos compostos foram determinados a 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 50, 50 e 100 μmol·L⁻¹, após 72 horas de tratamento pelo método de sobrevivência de células MTT. Abreviaturas: IG₅₀, concentração necessária para inibição de 50% da atividade celular; MTT, brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

A partir desses dados de citotoxicidade pode ser calculado o índice de resistência (RI), que determina a relação entre as células resistentes e parentais,

mostrando a resistência adquirida de cada linhagem celular para um determinado composto. O RI foi calculado com base na seguinte equação: $RI = IG_{50} \text{ célula resistente} / IG_{50} \text{ célula parental}$. Um valor de $RI > 1,0$ indica a capacidade do transportador ABC de conferir resistência àquele composto.

No grupo I, o composto **2b** que foi transportado pelas proteínas P-gp, ABCG2 e MRP1 apresentou índice de resistência de 8,6, 1,8 e 1,6, respectivamente (Tabela 7.2). Já no grupo II, o composto **4a** que foi substrato para a proteína P-gp apresentou índice de resistência de 1,9 (Tabela 7.2).

Tabela 7.2. Índice de resistência dos compostos 2b e 4a para as proteínas transportadoras Pgp, ABCG2 e MRP1.

Compostos	Índice de Resistência (RI)		
	NIH 3T3-Pgp	HEK293-ABCG2	BHK21-MRP1
2b	8,6	1,8	1,6
4a	1,9	-	-

Nota: O índice de resistência foi calculado com base na seguinte equação: $RI = IG_{50} \text{ célula resistente} / IG_{50} \text{ célula parental}$, quando $RI > 1,0$ indica que o composto foi substrato para o transportador estudado.

Vale destacar que o composto **2a** não apresentou qualquer fenótipo de resistência, não sendo transportado por nenhuma proteína ABC analisada. Entretanto, o composto **2a** foi altamente citotóxico para as linhagens celulares parentais (NIH3T3, HEK293 e BHK21) e as suas respectivas linhagens celulares resistentes (Tabela 7.1). Esse composto foi ainda o mais citotóxico para as linhagens celulares de glioblastoma (T98G, U87MG e U251) (Figuras 6.1, 6.2 e 6.3; Tabela 6.4). Os compostos **1a** e **1b** também não foram substratos para nenhum dos transportadores estudados (Tabela 7.1) e apresentam diferentes graus de citotoxicidade para as linhagens de glioblastomas (Figuras 6.1, 6.2 e 6.3). Os compostos **3a**, **3b** e **4b** apresentaram valores de IG_{50} maior que $100 \mu\text{M.L}^{-1}$ para as células parentais e resistentes, com

exceção do **3b** que apresentou citotoxicidade para a linhagem resistente BHK21-MRP1.

Apesar de ser efluxado, o composto **2b** foi citotóxico para todas as linhagens celulares de glioblastoma analisadas (Tabela 6.4). Estudos descritos na literatura¹⁴⁷ demonstram maior expressão da proteína MRP1 tanto nas linhagens em glioblastomas *in vitro* quanto *in vivo*. Neste sentido, o composto **2b** apresenta resultados interessantes, pois apesar de ser um substrato para MRP1, mantém alta citotoxicidade para células que expressam essa proteína.

O método mais simples e direto para reverter à resistência causada pelos transportadores ABC é bloquear o transporte de substratos através do uso de inibidores. Para provar que o composto **2b** atua como substrato para as três proteínas transportadoras ABC, realizou-se experimentos adicionais utilizando inibidores seletivos. Para P-gp foi empregado o inibidor GF120918 / elacridar e para ABCG2 foi empregado o inibidor Ko143. No caso de MRP1 não foram empregados inibidores, porém utilizou-se uma linhagem celular específica (BHK21-MRP1m) que expressa um mutante inativo para MRP1. A propriedade citotóxica do composto **2b** foi avaliada em todas as linhagens celulares parentais (NIH3T3, HEK293 e BHK21) e suas respectivas linhagens celulares resistentes (NIH3T3-Pgp, HEK-ABCG2 e BHK-MRP1m) com e sem o co-tratamento com os respectivos inibidores. A Figura 7.1 mostra que a utilização dos inibidores seletivos ou da linhagem celular mutante inativa aboliu o fenótipo de resistência (índice IR ~ 1), isto é, o transporte dos compostos pelas proteínas foi impedido, resultando na diminuição na porcentagem de células viáveis das linhagem resistentes. Para o composto **4a**, que foi substrato para a proteína P-gp, a propriedade citotóxica foi avaliada nas linhagens parental (NIH3T3) e resistente (NIH3T3-P-gp). A figura 7.2 mostra que a presença do inibidor GF120918 aboliu o fenótipo de resistência e diminuiu a porcentagem de células viáveis na linhagem resistente.

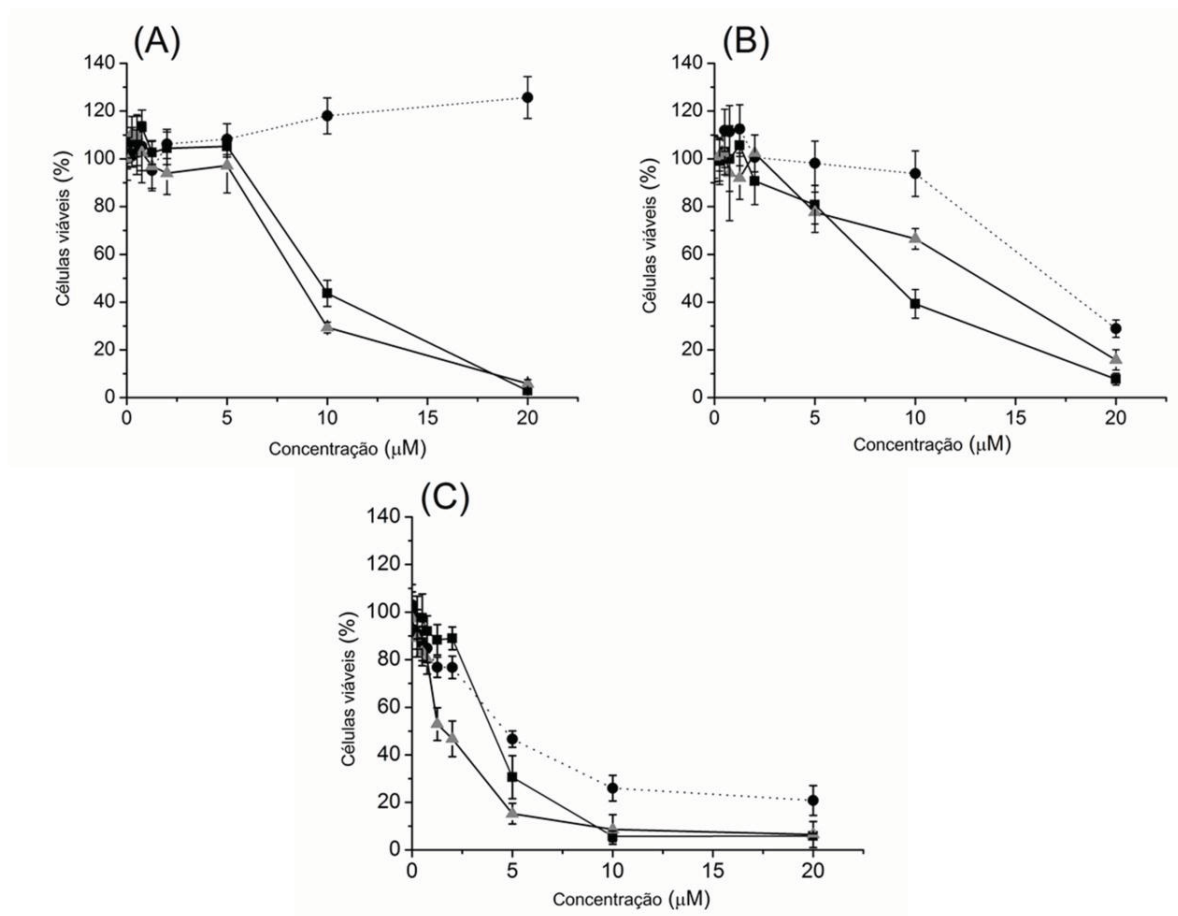


Figura 7.1. Efeito citotóxico do composto 2b em células que superexpressam proteínas ABC transportadoras. As células foram tratadas com o composto 2b em diferentes concentrações durante 72 horas com ou sem inibidores específicos de transportadores ABC. A citotoxicidade foi avaliada por ensaios de MTT: (A) (quadrado) NIH3T3, (círculo) NIH3T3-Pgp, (triângulo) NIH3T3-Pgp com GF12018 / elacridar (concentração $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (B) (quadrado) HEK293, (círculo) HEK293-ABCG2, (triângulo) HEK293-ABCG2 com Ko143 (concentração $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (C) (quadrado) BHK21, (círculo) BHK21-MRP1, (triângulo) BHK21-MRP1mutante. Os resultados foram expressos em % da viabilidade em comparação com o controle. Os dados representam resultados de quatro experimentos diferentes em quadruplicatas.

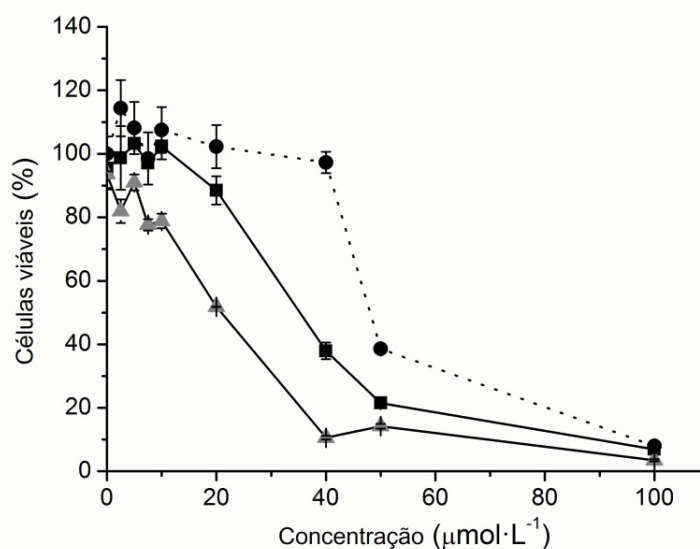


Figura 7.2. Efeito citotóxico do composto **4a** em células que superexpressam proteínas ABC transportadoras. As células foram tratadas com o composto 4a em diferentes concentrações durante 72 horas com ou sem inibidores específicos de transportadores ABC. A citotoxicidade foi avaliada por ensaios de MTT: (quadrado) NIH3T3, (círculo) NIH3T3-Pgp, (triângulo) NIH3T3-Pgp com GF12018 / elacridar (concentração $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Os resultados foram expressos em % da viabilidade em comparação com o controle. Os dados representam resultados de quatro experimentos diferentes em quadruplicatas.

Em relação à especificidade do substrato, os compostos transportados **2b** e **4a** são ambos catiônicos, estando de acordo com estudos⁸³ que mostraram que a superexpressão de P-gp e ABCG2 é capaz de promover fenótipo de resistência a compostos catiônicos.

É bem estabelecido que a proteína MRP1 é superexpressa em células derivadas de astrocitomas e glioblastomas¹⁴⁸ tanto *in vitro* quanto *in vivo*¹⁴⁷ e a inibição de MRP1 tem um efeito significativo na resposta de células de GBM a quimioterápicos em ambos os tumores GBM.¹⁴⁹ Foi descrito¹⁵⁰ que a linhagem celular T98G expressa níveis mais elevados de P-gp e MRP1 em modelos celulares de glioblastoma. Nossas

análises citotóxicas com linhagens celulares de glioblastoma mostraram que os valores de IG_{50} para o composto **2b** foram distintos nas diferentes células. Nas células T98G obteve-se o maior valor de IG_{50} ($24,77 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Na linhagem U87MG o valor obtido foi de $IG_{50} = 4,90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e na linhagem U251, $IG_{50} = 8,03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Considerando que o composto **2b** é transportado por MRP1, esses resultados são coerentes com os dados da literatura¹⁵⁰, que mostraram que os níveis de expressão de mRNA de MRP1 foram mais altos em células T98G do que em células U251 e U87MG.

A proteína MRP1 é capaz de transportar compostos aniônicos e conjugados de GSH.⁹⁵ Desta forma, uma possível explicação para o transporte do composto catiônico **2b** por MRP1 é sua conversão num ânion conjugado para ser transportado. Uma possibilidade é através da interação com a GSH, uma vez que MRP1 está frequentemente associado a altos níveis de GSH.⁹⁵

Na caracterização eletroquímica descrita no capítulo 4 item 4.6, observamos o processo de redução atribuído a 1 elétron do resíduo fenilazo ao ânion radical fenilazo ($\{-\text{N} = \text{N} \cdot\}$) em $E_{pc} = \sim -0,2 \text{ V}$ (acetonitrila) e $\sim -0,15 \text{ V}$ (diclorometano) para os compostos **2a** e **2b**. Uma vez que o valor de potencial de redução está próximo do potencial de oxidação do GSH para GSSG, os compostos **2a** ou **2b** podem reagir diretamente com o GSH promovendo sua oxidação. Portanto, os compostos **2a** e **2b** devem ser capazes de causar desequilíbrio no estado redox da célula e iniciar um conjunto de sinais celulares levando a apoptose. Isso poderia explicar a citotoxicidade desses compostos.

Dougan *et al.*⁵² relataram que os complexos de η^6 -arenorutênio(II) derivado de azopiridina têm a capacidade de catalisar a oxidação de GSH, através de um mecanismo que envolve um intermediário resultante da redução da ligação N=N, seguida pela formação de GSSG.

Para obter mais informações, investigamos a interação entre composto **2b** e GSH por espectroscopia UV-vis. A Figura 7.3 mostra o espectro de solução de GSH a $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (linha preta) que apresentou forte absorção em 290 nm. A solução de GSH com o composto **2b** exibiu após 10 segundos o espectro de linha azul onde, além da banda de GSH em 290 nm, a banda de composto **2b** π - π^* apareceu em 440 nm. Após 1 hora (Figura 7.3, linha vermelha), a banda de GSH em 290 nm desapareceu e a

absorção abaixo de 250 nm aumentou. Essas mudanças são semelhantes ao que aconteceu quando o GSH foi tratado com um equivalente de peróxido de hidrogênio (Figura 7.3 - linha de traço preto). A banda π - π^* de **2b** em 440 nm sofreu um deslocamento para 410 nm, revelando que **2b** foi modificado em solução, possivelmente através de mudanças na esfera de coordenação do centro de rutênio. Como demonstrado no capítulo 5, o composto possivelmente sofreu solvólise com a saída do ligante benzeno. O máximo em 410 nm não é consistente com o ligante livre **L2b**, (Capítulo 4, Figura 4.20), mas é muito similar ao espectro do composto **2b** após a saída de benzeno (Capítulo 5, Figura 5.1), indicando que a espécie formada contém o ligante anfifílico coordenado ao rutênio após a oxidação de GSH. Após 48 horas, a mistura produziu um espectro semelhante ao observado após 1 hora (Figura 7.3, linha vermelha), mas com um aumento de absorbância da banda abaixo de 250nm (dados não mostrados), revelando que o processo de oxidação de GSH continuou ocorrendo nesse período. Isso indica que mesmo com a saída do benzeno, a espécie gerada de **2b** é capaz de promover a oxidação de GSH.

A figura 7.4 apresenta o ciclo proposto para a oxidação de GSH a GSSG pelo composto **2b**. Não foi possível isolar nenhuma das espécies produzidas durante esse processo, mas é provável que algumas dessas espécies devam ser efluxadas e isso pode explicar porque o **2b** é um substrato de MRP1. Além disso, observamos que concentrações da ordem de $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ do composto **2b** pode oxidar quantidades mais elevadas de GSH após 1 hora. Há relatos na literatura¹⁵¹ de compostos com grupos azo que facilitam a oxidação de GSH, como o fármaco de procarbazina (grupo azo reduzido) $[\text{CH}_3\text{NH-NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONHCH}(\text{CH}_3)_2]$, usado principalmente para o tratamento do linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e tumores cerebrais primários, que é oxidado ao azo correspondente pelo meio e re-reduzido através da reação com GSH oxidado para GSSG.

Segundo Rocha *et al.*¹⁵² a diminuição dos níveis intracelulares de GSH possibilitou sensibilizar células de glioblastoma a morte, mostrando que o tratamento combinado do inibidor de GSH, *L*-Butionina-sulfoximina com temozolomida melhora a eficiência do quimioterápico.

O ligante fenilazo livre tem potenciais de redução em $E_{pc} = \sim -1.2$ V que é cerca de $-0,6$ V mais negativo que o potencial de redução do par GSSG/GSH, assim os ligantes livres não são capazes de oxidar GSH a GSSG. Quando o ligante está coordenado ao centro metálico de forma bidentada o valor de potencial de redução se torna mais positivo, $E_{pc} = \sim -0,2$ V, capaz de oxidar espontaneamente GSH a GSSG.

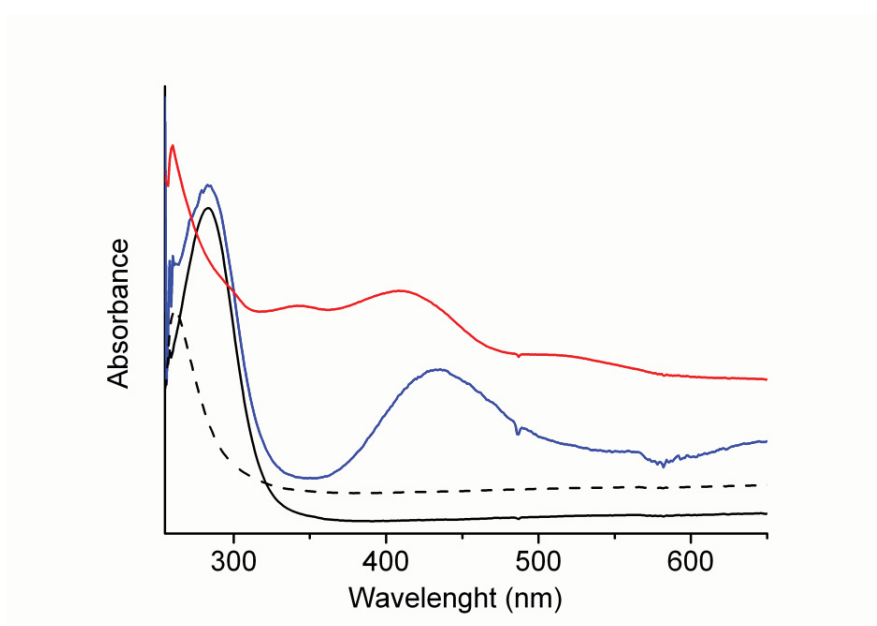


Figura 7.3. Espectros UV-vis da interação do composto **2b** com GSH. Espectros UV-vis (linha preta) GSH; (linha preta tracejada) solução de GSH tratada com equivalente de H_2O_2 ; (linha azul) GSH com a solução de composto **2b** após a interação por 10 segundos e (linha vermelha) após 1 hora. As concentrações utilizadas foram $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de GSH, $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_2O_2 e $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de composto **2b**, em DMSO à temperatura ambiente.

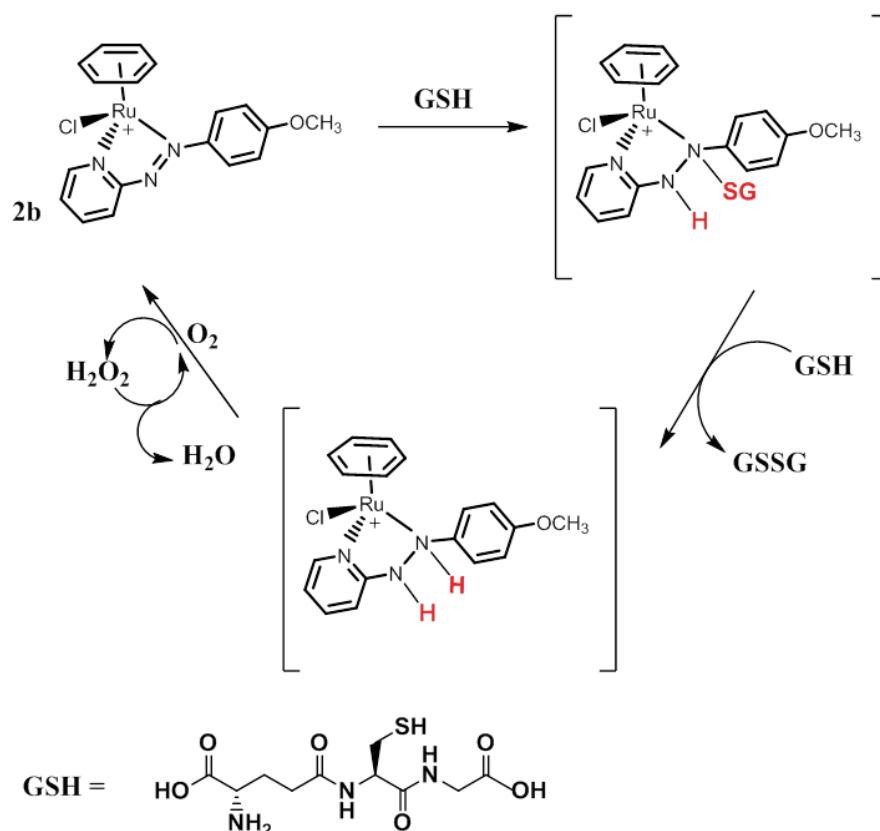


Figura 7.4. Ciclo proposto para a oxidação catalítica de GSH a GSSG pelo composto **2b**. Inicialmente ocorre a conjugação de GSH através da ligação dupla azo e posterior ocorre à redução do grupo azo para um grupo hidrazo e a oxidação de GSH a GSSG. O ciclo catalítico é concluído pela concomitante hidrogenação de O_2 dissolvido para gerar H_2O_2 . Adaptado de Dougan *et al.*⁵².

Para avaliar o papel funcional dos transportadores ABC no efeito citotóxico do composto **2b** em modelos de glioblastoma, células T98G foram tratadas com concentrações crescentes do composto **2b** na ausência e presença de inibidores de Pgp (GF120918), MRP1 (Verapamil) e ABCG2 (MBL141 e Ko143), e foi determinado se a inibição de cada um dos transportadores altera a citotoxicidade induzida pelo composto **2b**. A figura 7.5 mostra que quando a célula T98G foi tratada com o inibidor verapamil juntamente com o composto **2b** ocorreu diminuição da porcentagem de células viáveis quando comparadas com as células tratadas apenas com o composto

2b. Quando as células foram tratadas com o inibidor MBLI141 mais o composto **2b** foi observada uma pequena diminuição na porcentagem das células viáveis, comparadas com as células tratadas apenas com o **2b**. Nas células tratadas com os inibidores GF120918 e Ko143 mais o composto **2b** não foi observado mudanças. Como esses últimos inibem P-gp, esses resultados revelam que P-gp não tem papel no efluxo do composto **2b** em modelo de glioblastoma humano. Do mesmo modo, sabendo que MBLI141 é inibidor de ABCG2, esses resultados mostram que ABCG2 não tem papel significativo no efluxo do composto **2b** em modelo de glioblastoma humano. O único inibidor que causou mudanças drásticas na capacidade citotóxica do composto **2b** foi verapamil, revelando que MRP1 é o principal responsável pelo transporte do composto **2b** e consequentemente é capaz de promover maior resistência das células de glioblastoma T98G a este composto. Esses resultados sugerem que o composto **2b** é rapidamente conjugado com GSH nas células T98G. A hipótese que a interação com GSH é importante no mecanismo de ação de **2b** é sustentada pelo fato que células T98G são muito ricas em GSH em comparação com outras linhagens celulares, isso caracteriza maior resistência por parte dessas células.¹⁵² A célula T98G possui 450 nmol de GSH por mg de proteína, uma quantidade maior em comparação com outras linhagens celulares, como células BHK-21 ($\sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$) ou HeLa ($\sim 7 \text{ mmol} \cdot \text{mg}^{-1}$).¹⁵³

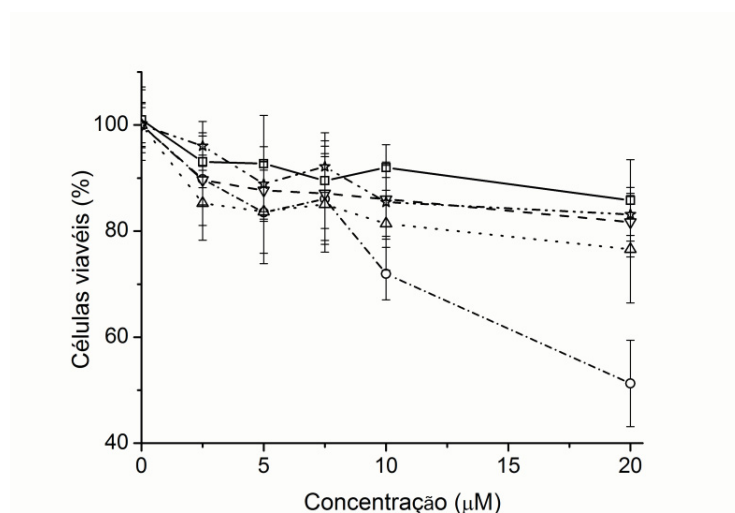


Figura 7.5. Efeitos citotóxicos do composto **2b** em células de glioblastoma T98G. As células foram tratadas com o composto **2b** a diferentes concentrações durante 72

horas com ou sem inibidores específicos de transportadores ABC. A citotoxicidade foi determinada por ensaios MTT: (quadrado) composto **2b** (0-20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (triângulo) composto **2b** com MBLI141 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (círculo) composto **2b** com verapamil (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (triângulo para baixo) composto **2b** com Ko143 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (estrela) composto **2b** com GF120918 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Os resultados foram expressos em % da viabilidade em comparação com o controle. Os dados representam resultados de dois experimentos diferentes em quadruplicatas.

7.2. Capacidade de inibição das proteínas transportadoras de múltiplas drogas da família ABC pelos compostos de η^6 -arenorutênio(II)

O método mais simples e direto para reverter à resistência causada pelos transportadores ABC é bloquear o transporte de substratos através do uso de inibidores. Por isso, avaliamos a capacidade de inibição do transporte de substratos das proteínas P-gp, ABCG2 e MRP1 pelos compostos de η^6 -arenorutênio(II). Para avaliar o efluxo pelos diferentes transportadores, utilizou-se substratos fluorescentes: a mitoxantrona para o transportador ABCG2 e calceína para os transportadores Pgp e MRP1. O transporte desses substratos foi analisado por citometria de fluxo.

Apenas o composto **1b** foi capaz de inibir o transporte de calceína mediado por P-gp nas células NIH3T3, atingindo um índice de 50% de inibição de transporte após tratamento com 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ do composto **1b** (Figura 7.6A).

Os compostos **1b** e **3b** foram capazes de inibir o transporte de mitoxantrona mediado por ABCG2 (Figura 7.6B), com índices de 22% e 35% de inibição, respectivamente, ambos na concentração de 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os compostos **2b** e **4b** inibiram fracamente o transporte de calceína mediado por MRP1 (Figura 7.6C), atingindo 13% de inibição na concentração de 5 e 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para os compostos **2b** e **4b** respectivamente.

Devido ao fato do composto **1b** ter sido o mais eficiente em promover inibição do transporte mediado pela proteína P-gp, nós avaliamos sua ação em conjunto com o composto **2b** (o composto mais citotóxico e capaz de ser transportado pelos três

transportadores ABC analisados) na linhagem T98G. No entanto, os resultados não mostraram alteração significativa na porcentagem de células metabolicamente ativas após o tratamento combinado dos compostos **1b** e **2b** em comparação com o tratamento isolado do composto **2b**, corroborando resultados apresentados na Figura 7.5 mostrando que P-gp não tem papel no efluxo do composto **2b** em modelo de glioblastoma humano.

Esses resultados mostram que os compostos de η^6 -arenorutênio(II) não são eficientes inibidores das proteínas transportadoras ABC, uma vez que Ko143, GF120918 e verapamil são eficientes inibidores seletivos capazes de suprimir em 100% o transporte nas concentrações de 1, 5 e 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente^{154, 155}

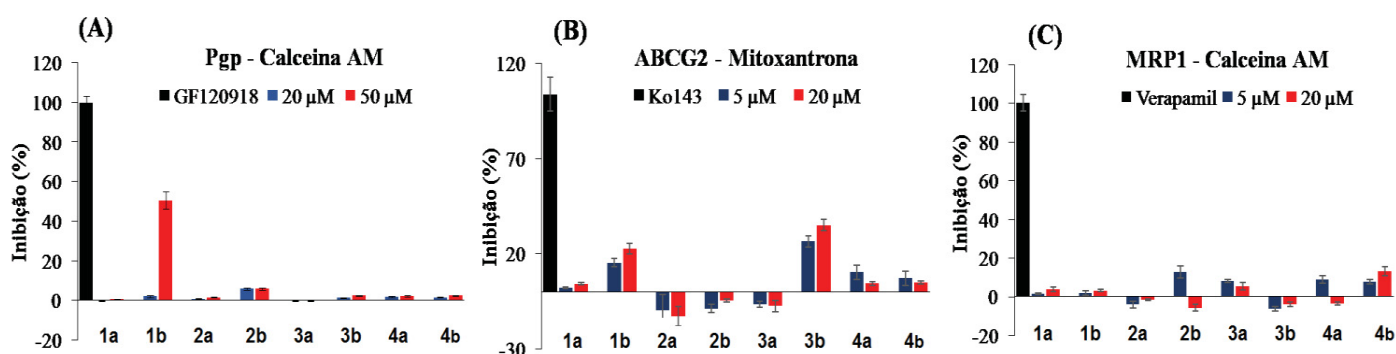


Figura 7.6. Efeito dos compostos de η^6 -arenorutênio (II) sobre o transporte mediado por (A) Pgp, (B) ABCG2 e (C) MRP1. (As condições experimentais são descritas no Capítulo 3 no item 3.8).

7.3. Conclusões parciais

Os compostos **2b** e **4a** foram substratos para transportadores ABC. O composto **2b** é transportado por P-gp, ABCG2 e MRP1 e o **4a** somente por P-gp. O composto **2b**, apesar de ser substrato para os três transportadores avaliados, manteve alta citotoxicidade para as linhagens celulares de glioblastoma.

O composto **2b** interage com GSH e, provavelmente, essa interação é responsável pelo seu efluxo por MRP1 e seu efeito citotóxico. O fato de GSH ser o provável alvo de ação, o que resulta numa diminuição da concentração intracelular de GSH, seja por efluxo ou oxidação catalítica, confere ao composto **2b** uma excelente potencialidade de ação, uma vez que a depleção dos níveis de GSH leva a uma melhora no resultado clínico em GBM.¹⁵²

O composto **2a** apresentou elevada citotoxicidade para as linhagens celulares de glioblastoma humano e não foi substrato para os transportadores ABC estudados. Em contrapartida, os compostos **1a**, **1b**, **3a**, **3b** e **4b** apresentaram $IG_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para as linhagens parentais e resistentes, e nas células de glioblastoma humano apresentam diferentes graus de citotoxicidade.

Capítulo 8:

Conclusões

Capítulo 8 – Conclusões

8.1. Conclusões

Todos os compostos previstos foram sintetizados e purificados, e os resultados de RMN de ^1H , FTIR, UV-vis indicam que as estruturas idealizadas foram obtidas pelas sínteses. As bandas intensas $\pi^* \leftarrow \pi$ dos ligantes no espectro UV, são deslocadas para o vermelho nos complexos de η^6 -arenorutênio. Além disso, esses ligantes possuem um alto caráter π -aceitador através do orbital π^* , estabilizando os complexos de rutênio em seu estado de oxidação mais baixo e deslocando o potencial redox para valores mais positivos. O processo redox observado para os compostos do grupo I são somente da redução do ligante azo.

As reações de substituição em solução revelou a saída do ligante benzeno, que pode ser entendida considerando o forte caráter π -aceitador dos ligantes azo/oxadiazó que competem com a ligação η^6 -areno a Ru(II), que é reforçada pela retrodoação π do centro de rutênio. Em solução se tem um equilíbrio de diferentes espécies que no mesmo tempo utilizado para os dos ensaios biológicos (72h) ainda contém aproximadamente 70% dos compostos na forma de η^6 -arenorutênio(II), inicialmente preparados.

Os compostos catiônicos 2a, 2b, 4a e 4b sofrem reação de solvólise pela perda do ligante benzeno numa cinética de primeira ordem, com valores das constantes observadas da mesma ordem de grandeza, independente do ligante azo/oxadiazó coordenado, ocorrendo mais facilmente nos compostos catiônicos. Os compostos com os ligantes azo (grupo I) 2a e 2b sofrem solvólise e são bastantes citotóxicos, os compostos com os ligantes oxadiazó (grupo II) 4a e 4b também sofrem solvólise, mas apenas o 4a apresenta citotoxicidade, enquanto o 4b apresentou baixa citotoxicidade, mostrando que a concentração de benzeno livre não é citotóxico para as células.

Os compostos de η^6 -arenorutênio pertencentes ao grupo I foram todos citotóxicos para as linhagens celulares de glioma, enquanto que somente o composto 4a do grupo

II apresentou alta citotoxicidade. Os compostos mais hidrofóbicos contendo ligantes de cadeia longa tendem a ser mais citotóxicos que os compostos que possuem um grupo metoxi. Os compostos catiônicos de η^6 -arenorutênio (II) foram mais citotóxicos do que os neutros. Essa citotoxicidade foi atribuída a alterações da progressão do ciclo celular e aumento do conteúdo de DNA fragmentado, sugerindo um mecanismo apoptótico. A continuidade desse estudo será voltada para investigar se o mecanismo de morte celular apoptótica ocorre por via intrínseca, através da avaliação da ativação de caspase 3 e liberação do citocromo C.

Dois compostos foram substratos para transportadores ABC multidrogas: composto 2b (para Pgp, ABCG2 e MRP1) e 4a (para Pgp). Especificamente para o composto 2b, além de ser um substrato para os três transportadores estudados aqui, este composto também foi citotóxico para as linhagens celulares de glioblastoma. Mostramos que concentrações micromolares do composto 2b pode esgotar concentrações milimolares de GSH durante 1 hora por oxidação catalítica para GSSG. Assim, o composto 2b interage com o GSH e isso constitui uma possível explicação do seu efluxo pelo MRP1 e seu efeito citotóxico. Além disso, essa interação diminui a concentração intracelular de GSH, podendo melhorar o resultado clínico. Existem relatos na literatura que células resistentes apresentam níveis mais elevados de GSH intracelular, como o estudo de Rocha *et al.*¹⁵² que demonstrou que a diminuição dos níveis de GSH possibilita sensibilizar as células de glioma a morte, pelo tratamento combinado com temozolomida. Assim, investigar o mecanismo de ação dos compostos η^6 -arenorutênio(II) envolvendo GSH amplia nosso estudo e ainda, considerando estudos de tratamentos combinados dos compostos de η^6 -arenorutênio(II) com o quimioterápico padrão temozolomida é bastante promissor.

O composto 2a mostrou alta citotoxicidade para as linhagens celulares de glioblastoma humano e não foi um substrato para os transportadores ABC estudados. Já o composto 1b, apresentou menor valor de $IG_{50} = 31.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, para a linhagem celular T98G, que apresentou ser a mais resistente das linhagens estudadas. Logo, o composto 1b é bastante promissor, uma vez que, essa linhagem também é resistente à ação da temozolomida, o quimioterápico padrão, mesmo *in vitro*.

Os compostos 2a, 2b e 4a, são bastantes promissores também, pois em concentrações baixas quando expostos a tempo prolongado (72 horas) apresentaram alta citotoxicidade, diferente dos compostos análogos estudados por Dougan *et al.*⁵² que apresentaram citotoxicidade em concentrações mais altas quando expostos por tempo curto (24 horas) em modelo de carcinoma de pulmão e ovário. Mas, os compostos que não apresentaram citotoxicidade também são promissores, podendo ser investigados com possíveis agentes antimetastáticos, como o RAPTA-C, que não apresentou citotoxicidade *in vitro*, mas inibiu metástase pulmonar *in vivo*.

O trabalho ainda mostrou pela primeira vez o transporte de complexos de rutênio pelas proteínas transportadoras ABC, destacando que mesmo sendo transportados apresentaram citotoxicidade. Além disso, propomos que o mecanismo de ação dos compostos citotóxicos envolve interação com GSH com consequente diminuição de sua concentração. O trabalho abriu novas perspectivas de estudo, como a investigação de possíveis agentes antimetastáticos com os compostos que apresentaram menor citotoxicidade *in vitro*.

Capítulo 9:

Referências Bibliográficas

Capítulo 9 – Referências Bibliográficas

1. Betini, I.; Gray, H. B.; Lippard, S. J.; Valentini, J. S. *Bioinorganic Chemistry*. **1994**, 766.
2. Köpf, H.; Köpf-Maier, P. Titanocene Dichloride—The First Metallocene with Cancerostatic Activity. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1979**, 18, 477-478.
3. Köpf-Maier, P.; Hesse, B.; Voigtländer, R.; Köpf, H. Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of titanocene dihalides (C₅H₅)₂TiX₂ (X=F, Cl, Br, I, NCS) and their application in buffered solutions as a method for suppressing drug-induced side effects. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1980**, 97, 31-39.
4. Köpf-Maier, P.; Köpf, H. Tumor inhibition by titanocene dichloride: First clues to the mechanism of action. *Naturwissenschaften* **1980**, 67, 415-416.
5. Mross, K.; Robben-Bathe, P.; Edler, L.; Baumgart, J.; Berdel, W. E.; Fiebig, H.; Unger, C. Phase I Clinical Trial of a Day-1, -3, -5 Every 3 Weeks Schedule with Titanocene Dichloride (MKT 5) in Patients with Advanced Cancer: A Study of the Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology (AIO) of the German Cancer Society. *Onkologie*. **2000**, 23, 576–579.
6. Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M. A. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews* **2015**, 284, 329-350.
7. Suss-Fink, G. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton Transactions* **2010**, 39, 1673-1688.
8. Komeda, S.; Casini, A. Next-Generation Anticancer Metallodrugs. *Current topics in medicinal chemistry* **2012**, 12, 219-235.
9. Han Ang, W.; Dyson, P. J. Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2006**, 2006, 4003-4018.
10. Dyson, P. J. Systematic Design of a Targeted Organometallic Antitumour Drug in Pre-clinical Development. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2007**, 61, 698-703.
11. Lazarevic, T.; A., R. D.; Bugarcic, Z. D. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 1-24.
12. Gasser, G.; Metzler-Nolte, N., The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **2012**, 16, 84-91.
13. Durig, J. R.; Danneman, J.; Behnke, W. D.; Mercer, E. E., The induction of filamentous growth in *Escherichia coli* by ruthenium and palladium complexes. *Chemico-biological interactions* **1976**, 13, 287-94.
14. Keppler, B. K. e. H., M., New Tumor-Inhibiting Metal Complexes. Chemistry and Antitumor Properties. *Met Based Drugs* **1994**, 1, 145-149.
15. Rademaker-Lakhai JM, V. D. B. D.; Pluim D.; Beijnen J.H.; Schellens J.H., A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-

- tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clin Cancer Res.* **2004**, *10*, 3717-3727.
16. Alessio, E.; Mestroni, G.; Bergamo, A.; Sava, G., Ruthenium antimetastatic agents. *Current topics in medicinal chemistry* **2004**, *4*, 1525-35.
 17. Ravera, M.; Baracco, S.; Cassino, C.; Colangelo, D.; Bagni, G.; Sava, G.; Osella, D., Electrochemical measurements confirm the preferential bonding of the antimetastatic complex [ImH][RuCl₄(DMSO)(Im)] (NAMI-A) with proteins and the weak interaction with nucleobases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, *98*, 984-990.
 18. Zorzet, S.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Sorc, A.; Gava, B.; Alessio, E.; Iengo, E.; Sava, G., Lack of In Vitro Cytotoxicity, Associated to Increased G₂-M Cell Fraction and Inhibition of Matrigel Invasion, May Predict In Vivo-Selective Antimetastasis Activity of Ruthenium Complexes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, *295*, 927-933.
 19. Casini, A., Exploring the mechanisms of metal-based pharmacological agents via an integrated approach. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *109*, 97-106.
 20. Alessio, E., Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**, *2017*, 1549-1560.
 21. Hartinger, C. G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, M. A.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B. K., From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, *100*, 891-904.
 22. Antonarakis, E.; Emadi, A., Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2010**, *66*, 1-9.
 23. Fischer, B.; Heffeter, P.; Kryeziu, K.; Gille, L.; Meier, S. M.; Berger, W.; Kowol, C. R.; Keppler, B. K., Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 1096-1104.
 24. Aitken, J. B.; Antony, S.; Weekley, C. M.; Lai, B.; Spiccia, L.; Harris, H. H., Distinct cellular fates for KP1019 and NAMI-A determined by X-ray fluorescence imaging of single cells. *Metallomics* **2012**, *4*, 1051-1056.
 25. Clarke, M. J., Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews* **2003**, *236*, 209-233.
 26. Zhang, P.; Sadler, P. J., Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**, *2017*, 1541-1548.
 27. Timerbaev, A. R., Role of metallomic strategies in developing ruthenium anticancer drugs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *80*, 547-554.
 28. Clarke, M. J., Zhu, F., Frasca, D. R., Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2511-2534.
 29. Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Ellis, D. J.; Heath, S. L., [Ru(η^5 -cymene)Cl(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo-[3.3.1.1]decane): a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells. *Chemical Communications* **2001**, 1396-1397.

30. Scolaro, C.; Bergamo, A.; Brescacin, L.; Delfino, R.; Cocchietto, M.; Laurenczy, G.; Geldbach, T. J.; Sava, G.; Dyson, P. J., In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4161-4171.
31. Therrien, B., Functionalised η^6 -arene ruthenium complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 493-519.
32. Kealy, J., Pauson, P.L. , A new type of organo-iron compound. *Nature* **1951**, *168*, 1039.
33. Wilkinson, G., Rosenblum, M., Whiting, M.C., Woodward, R.B., The structure of iron bzs-cyclopentadienyl. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2125.
34. Wilkinson, G., Bis-cyclopentadienyl derivatives of some transition elements. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 6146.
35. Fischer, E. O.; Böttcher, R., Über Aromatenkomplexe von Metallen. Ein Komplex des Ruthenium(II) mit Mesitylen. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **1957**, *291*, 305-309.
36. Bennett, M. A.; Matheson, T. W., A simple preparation of bis-arene-ruthenium cationic complexes, including those containing different arenes. *Journal of Organometallic Chemistry* **1979**, *175*, 87-93.
37. Zelonka, R. A.; Baird, M. C., Benzene Complexes of Ruthenium(II). *Canadian Journal of Chemistry* **1972**, *50*, 3063-3072.
38. Bennett, M. A.; Smith, A.K., Arene ruthenium (II) complexes formed by dehydrogenation of cyclohexadienes with ruthenium (III) chlorides. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1974**, 233.
39. Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Ellis, D. J.; Salter, P. A.; Scopelliti, R., Synthesis and characterisation of some water soluble ruthenium(II)/arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. *Journal of Organometallic Chemistry* **2003**, *668*, 35-42.
40. Chen, H. M.; Parkinson, J. A.; Morris, R. E.; Sadler, P. J., Highly Selective Binding of Organometallic Ruthenium Ethylenediamine Complexes to Nucleic Acids: Novel Recognition Mechanisms. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 173-186.
41. Sanz, S.; Azua, A.; Peris, E., '[η^6 -arene)Ru(bis-NHC)]' complexes for the reduction of CO₂ to formate with hydrogen and by transfer hydrogenation with iPrOH. *Dalton Transactions* **2010**, *39*, 6339-6343.
42. Mishra, A.; Ravikumar, S.; Song, Y. H.; Prabhu, N. S.; Kim, H.; Hong, S. H.; Cheon, S.; Noh, J.; Chi, K.-W., A new arene-Ru based supramolecular coordination complex for efficient binding and selective sensing of green fluorescent protein. *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 6032-6040.
43. Therrien, B., Functionalised η^6 -arene ruthenium complexes. *Chem. Commun.* **2009**, 253, 493-519.
44. Smith, G. S.; Therrien, B., Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics. *Dalton Transactions* **2011**, *40*, 10793-10800.
45. Hartinger, C. G.; Metzler-Nolte, N.; Dyson, P. J., Challenges and Opportunities in the Development of Organometallic Anticancer Drugs. *Organometallics* **2012**, *31*, 5677-5685.

46. Ang, W. H.; Daldini, E.; Scolaro, C.; Scopelliti, R.; Juillerat-Jeannerat, L.; Dyson, P. J., Development of Organometallic Ruthenium–Arene Anticancer Drugs That Resist Hydrolysis. *Inorganic Chemistry* **2006**, *45*, 9006-9013.
47. Murray, B. S.; Babak, M. V.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J., The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors. *Coordination Chemistry Reviews* **2016**, *306*, 86-114.
48. Novakova, O.; Chen, H.; Vrana, O.; Rodger, A.; Sadler, P. J.; Brabec, V., DNA Interactions of Monofunctional Organometallic Ruthenium(II) Antitumor Complexes in Cell-free Media†. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11544-11554.
49. Chen, H.; Parkinson, J. A.; Morris, R. E.; Sadler, P. J., Highly Selective Binding of Organometallic Ruthenium Ethylenediamine Complexes to Nucleic Acids: Novel Recognition Mechanisms. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *125*, 173-186.
50. Noffke, A. L.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; Sadler, P. J., Designing organometallic compounds for catalysis and therapy. *Chemical Communications* **2012**, *48*, 5219-5246.
51. Romero-Canelón, I.; Sadler, P. J., Next-Generation Metal Anticancer Complexes: Multitargeting via Redox Modulation. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12276–12291.
52. Dougan, S. J.; Habtemariam, A.; Mchale, S. E.; Parsons, S.; Sadler, P. J., Catalytic organometallic anticancer complexes. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 11628-11633.
53. Dougan, S. J.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Parsons, S.; Sadler, P. J., Phenylazo-pyridine and Phenylazo-pyrazole Chlorido Ruthenium(II) Arene Complexes: Arene Loss, Aquation, and Cancer Cell Cytotoxicity. *Inorganic Chemistry* **2006**, *45*, 10882-10894.
54. Somani, R. R.; Shirodkarb, P. Y., Oxadiazole: A biologically important heterocycle. *Der Pharma Chemica* **2009**, *1*, 130-140.
55. Jhanwar-Uniyal, M.; Labagnara, M.; Friedman, M.; Kwasnicki, A.; Murali, R., Glioblastoma: Molecular Pathways, Stem Cells and Therapeutic Targets. *Cancers* **2015**, *7*, 538.
56. Salacz ME; Watson KR; DA., S., Glioblastoma: Part I. Current state of affairs. . *Mo Med.* **2011**, *108*, 187-94.
57. Furnari, F. B.; Fenton, T.; Bachoo, R. M.; Mukasa, A.; Stommel, J. M.; Stegh, A.; Hahn, W. C.; Ligon, K. L.; Louis, D. N.; Brennan, C.; Chin, L.; DePinho, R. A.; Cavenee, W. K., Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development* **2007**, *21*, 2683-2710.
58. Van Meir, E.G.; Hadjipanayis, C.G.; Norden, A.D.; Shu, H.K.; Wen, P.Y., Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. . *CA Cancer J Clin* **2010**, *60*, 166–93.
59. Kubacek, P.; Hoffmann, R., Deformations from octahedral geometry in d4 transition-metal complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 4320-4332.
60. Pointer, K. B.; Clark, P. A.; Zorniak, M.; Alrfaei, B. M.; Kuo, J. S., Glioblastoma cancer stem cells: Biomarker and therapeutic advances. *Neurochemistry International* **2014**, *71*, 1-7.

61. Minniti, G.; Muni, R.; Lanzetta, G.; Marchetti, P.; Enrici, R. M., Chemotherapy for Glioblastoma: Current Treatment and Future Perspectives for Cytotoxic and Targeted Agents. *Anticancer Research* **2009**, *29*, 5171-5184.
62. El Kazzouli, S.; El Brahmí, N.; Mignani, S.; Bousmina, M.; Zablocka, M.; P. Majoral, J., From Metallodrugs to Metallodendrimers for Nanotherapy in Oncology: A Concise Overview. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 4995-5010.
63. Brandes, A. A.; Basso, U.; Reni, M.; Vastola, F.; Tosoni, A.; Cavallo, G.; Scopece, L.; Ferreri, A. J.; Panucci, M. G.; Monfardini, S.; Ermani, M., First-Line Chemotherapy With Cisplatin Plus Fractionated Temozolomide in Recurrent Glioblastoma Multiforme: A Phase II Study of the Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia. *Journal of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 1598-1604.
64. Züstovich, F.; Lombardi, G.; Della Puppa, A.; Rotilio, A.; Scienza, R.; Pastorelli, D., A Phase II Study of Cisplatin and Temozolomide in Heavily Pre-treated Patients with Temozolomide-refractory High-grade Malignant Glioma. *Anticancer Research* **2009**, *29*, 4275-4279.
65. Nowacek, A.; Gendelman, H. E., NanoART, neuroAIDS and CNS drug delivery. *Nanomedicine* **2009**, *4*, 557-574.
66. Paula C. Huber; Maruiama, C. H.; Almeida, W. P., Glicoproteína-p, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 2148-2154.
67. Deeken, J. F.; Löscher, W., The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clinical Cancer Research* **2007**, *13*, 1663-1674.
68. Qosa, H.; Miller, D. S.; Pasinelli, P.; Trotti, D., Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders. *Brain Research* **2015**, *1628, Part B*, 298-316.
69. Cervenak, J.; Andrikovics, H.; Özvegy-Laczka, C.; Tordai, A.; Némét, K.; Váradi, A.; Sarkadi, B., The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. *Cancer Letters* **2006**, *234*, 62-72.
70. Borst, P.; Schinkel, A. H., P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals. *The Journal of Clinical Investigation* **2013**, *123*, 4131-4133.
71. Vlaming, M. L. H.; Lagas, J. S.; Schinkel, A. H., Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): Recent findings in Abcg2 knockout mice. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61*, 14-25.
72. Pluchino, K. M.; Hall, M. D.; Goldsborough, A. S.; Callaghan, R.; Gottesman, M. M., Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug Resistance Updates* **2012**, *15*, 98-105.
73. Tamaki, A.; Ierano, C.; Szakacs, G.; Robey, R. W.; Bates, S. E., The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays In Biochemistry* **2011**, *50*, 209-232.
74. Mo, W.; Zhang, J.-T., Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **2012**, *3*, 1-27.
75. Higgins, C. F., ABC TRANSPORTERS: From Microorganisms to Man. *Annu. Rev. Cell Bioi.* **1992**, *8*, 67-113.
76. Hollenstein, K.; Dawson, R. J. P.; Locher, K. P., Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **2007**, *17*, 412-418.

77. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Varadi, A., Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiological reviews* **2006**, *86*, 1179-236.
78. DANØ, K. A., Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1973**, *33*, 466-483.
79. Fukuda, Y.; Schuetz, J. D., ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochemical Pharmacology* **2012**, *83*, 1073-1083.
80. Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* **2001**, *42*, 1007-1017.
81. Chang, G., Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Letters* **2003**, *555*, 102-105.
82. Doshi, R.; Gutmann, Daniel A. P.; Khoo, Yvonne S. K.; Fagg, Lisa A.; van Veen, Hendrik W., The choreography of multidrug export. *Biochemical Society Transactions* **2011**, *39*, 807-811.
83. Kathawala, R. J.; Gupta, P.; Ashby Jr, C. R.; Chen, Z.-S., The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates* **2015**, *18*, 1-17.
84. Juliano, R. L.; Ling, V., A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1976**, *455*, 152-162.
85. Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. V., Deeley, R. G., Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **1992**, *258*, 1650-4.
86. Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; Ross, D. D., A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 15665-15670.
87. Chen, Z.; Shi, T.; Zhang, L.; Zhu, P.; Deng, M.; Huang, C.; Hu, T.; Jiang, L.; Li, J., Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters* **2016**, *370*, 153-164.
88. Daood, M.; Tsai, C.; Ahdab-Barmada, M.; Watchko, J. F., ABC Transporter (P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) Expression in the Developing Human CNS. *Neuropediatrics* **2008**, *39*, 211-218.
89. Jones, P. M.; George, A. M., A reciprocating twin-channel model for ABC transporters. *Quarterly Reviews of Biophysics* **2014**, *47*, 189-220.
90. Tarling, E. J.; Vallim, T. Q. d. A.; Edwards, P. A., Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2013**, *24*, 342-350.
91. Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M., Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5*, 219.
92. Sodani, K.; Patel, A.; Kathawala, R. J.; Chen, Z.-S., Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese Journal of Cancer* **2012**, *31*, 58-72.

93. Eckford, P. D.; Sharom, F. J., ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* **2009**, *109*, 2989-3011.
94. Ma, S.I.; Hu, Y.P.; Wang, F.; Huang, Z.C.; Chen, Y.F.; Wang, X.K.; Fu, L.W., Lapatinib Antagonizes Multidrug Resistance–Associated Protein 1–Mediated Multidrug Resistance by Inhibiting Its Transport Function. *Molecular Medicine* **2014**, *20*, 390-399.
95. Cole, S. P. C.; Deeley, R. G., Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends in Pharmacological Sciences* **2006**, *27*, 438-446.
96. Cole, S. P.; Deeley, R. G., Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci* **2006**, *27*, 438-46.
97. Cole, S. P. C., Targeting Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1): Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 95–117.
98. Tews DS; Nissen A; Kulgen C; AK., G., Drug resistance-associated factors in primary and secondary glioblastomas and their precursor tumors. *J Neurooncol* **2000**, *50*, 227–37.
99. Bleau AM; and, H. J.; EC., H., The ABCG2 resistance network of glioblastoma. *Cell Cycle* **2005**, *8*, 2937-2945.
100. Löscher, W.; Potschka, H., Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews Neuroscience* **2005**, *6*, 591.
101. Demeule, M.; Régina, A.; Jodoin, J.; Laplante, A.; Dagenais, C.; Berthelet, F.; Moghrabi, A.; Béliveau, R., Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood–brain barrier. *Vascular Pharmacology* **2002**, *38*, 339-348.
102. Löscher, W.; Potschka, H., Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family. *NeuroRX* **2005**, *2*, 86-98.
103. Löscher, W.; Potschka, H., Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology* **2005**, *76*, 22-76.
104. Zhang, Y.; Schuetz, J. D.; Elmquist, W. F.; Miller, D. W., Plasma Membrane Localization of Multidrug Resistance-Associated Protein Homologs in Brain Capillary Endothelial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, *311*, 449-455.
105. Caratozzolo C; Gelati M; Ciusani E; Sciacca FL; Pollo B; Cajola L; al., e., Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. . *J Neurooncol* **2005**, *74*, 113-21.
106. Benyahia B; Huguet S; Decleves X; Mokhtari K; Criniere E; Bernaudin JF; al., e., Multidrug resistance-associated protein MRP1 expression in human gliomas: chemosensitization to vincristine and etoposide by indomethacin in human glioma cell lines overexpressing MRP1. *J Neurooncol* **2004**, *66*, 65-70.
107. Declèves, X.; Fajac, A.; Lehmann-Che, J.; Tardy, M.; Mercier, C.; Hurbain, I.; Laplanche, J.-L.; Bernaudin, J.-F.; Scherrmann, J.-M., Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines. *International Journal of Cancer* **2002**, *98*, 173-180.
108. Benyahia, B.; Huguet, S.; Declèves, X.; Mokhtari, K.; Crinière, E.; Bernaudin, J. F.; Scherrmann, J. M.; Delattre, J. Y., Multidrug Resistance-Associated Protein MRP1 Expression in Human Gliomas: Chemosensitization to Vincristine and Etoposide

- by Indomethacin in Human Glioma Cell Lines Overexpressing MRP1. *Journal of Neuro-Oncology* **2004**, 66, 65-70.
109. Bleau, A.-M.; Huse, J. T.; Holland, E. C., The ABCG2 resistance network of glioblastoma. *Cell Cycle* **2009**, 8, 2937-2945.
110. Bleau, A.-M.; Hambardzumyan, D.; Ozawa, T.; Fomchenko, E. I.; Huse, J. T.; Brennan, C. W.; Holland, E. C., PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell* **2009**, 4, 226-235.
111. Schafer, F. Q.; Buettner, G. R., Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, 30, 1191-1212.
112. Cole, S. P. C., Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a "Multitasking" ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, 289, 30880-30888.
113. Leslie, E. M.; Bowers, R. J.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C., Structural Requirements for Functional Interaction of Glutathione Tripeptide Analogs with the Human Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, 304, 643-653.
114. Ballatori, N.; Krance, S. M.; Marchan, R.; Hammond, C. L., Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Molecular Aspects of Medicine* **2009**, 30, 13-28.
115. Ballatori N, K. S., Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. , Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. . *Biol. Chem.* **2009**, 390, 191–214.
116. Mueller, C. F. H.; Afzal, S.; Becher, U. M.; Wassmann, S.; Nickenig, G.; Wassmann, K., Role of the multidrug resistance protein-1 (MRP1) for endothelial progenitor cell function and survival. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2010**, 49, 482-489.
117. Bennett, M. A.; Matheson, T. W., A simple preparation of bis-arene-ruthenium cationic complexes, including those containing different arenes. *Journal of Organometallic Chemistry* **1979**, 175, 87-93.
118. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65, 55-63.
119. Riccardi, C.; Nicoletti, I., Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protocols* **2006**, 1, 1458-1461.
120. Subarkhan, M. K. M.; Ramesh, R., Ruthenium(ii) arene complexes containing benzhydrazone ligands: synthesis, structure and antiproliferative activity. *Inorganic Chemistry Frontiers* **2016**, 3, 1245-1255.
121. Haigh, C. W.; Mallion, R. B., Ring current theories in nuclear magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1979**, 13, 303-344.
122. Pazderski, L.; Toušek, J.; Sitkowski, J.; Kozerski, L.; Marek, R.; Szłyk, E., ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR coordination shifts in gold(III), cobalt(III), rhodium(III) chloride complexes with pyridine, 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2007**, 45, 24-36.

123. Palepu, N. R.; Adhikari, S.; J, R. P.; Verma, A. K.; Shepherd, S. L.; Phillips, R. M.; Kaminsky, W.; Kollipara, M. R., Half-sandwich ruthenium, rhodium and iridium complexes featuring oxime ligands: Structural studies and preliminary investigation of in vitro and in vivo anti-tumour activities. *Appl. Organomet. Chem.* **2017**, *31*, e3640-n/a.
124. Wang, H.; DeYonker, N. J.; Zhang, X.; Zhao, C.; Ji, L.; Mao, Z.-W., Photodissociation of a ruthenium(II) arene complex and its subsequent interactions with biomolecules: a density functional theory study. *Journal of Molecular Modeling* **2012**, *18*, 4675-4686.
125. Gore, P. H., Wheeler, O.H, Absorption Spectra of Aromatic Azo and Related Compounds. III. Substituted Azobenzenes *The Journal of Organic Chemistry* **1961**, *26*, 3295-3298.
126. Tamai, N.; Miyasaka, H., Ultrafast Dynamics of Photochromic Systems. *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 1875-1890.
127. Singh, K. S.; Kreisel, K. A.; Yap, G. P. A.; Kollipara, M. R., Synthesis of arene ruthenium triazolato complexes by cycloaddition of the corresponding arene ruthenium azido complexes with activated alkynes or with fumaronitrile. *Journal of Organometallic Chemistry* **2006**, *691*, 3509-3518.
128. Chen, L.; Yang, C.; Li, M.; Qin, J.; Gao, J.; You, H.; Ma, D., Supramolecular Architectures, Photophysics, and Electroluminescence of 1,3,4-Oxadiazole-Based Iridium(III) Complexes: From μ -Dichloro Bridged Dimer to Mononuclear Complexes. *Crystal Growth & Design* **2006**, *7*, 39-46.
129. Sadler, J. L.; Bard, A. J., The Electrochemical Reduction of Aromatic Azo Compound. *J. Am. Chem. Soc.* (**1968**) **1979**, *90*.
130. Goswami, S.; Mukherjee, R.; Chakravorty, A., Chemistry of Ruthenium. 12.' Reactions of Bidentate Ligands with Diaquobis[2-(aryloxy)pyridine]ruthenium(II) Cation. Stereoretentive Synthesis of Tris Chelates and Their Characterization: Metal Oxidation, Ligand Reduction, and Spectroelectrochemical Correlation. *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 2825-2832.
131. S., P., The Chemistry of Hydrazo, Azo and Azoxy Groups (Wiley, Bristol, UK). **1975**.
132. Pazinato, J.; Hoffmeister, D. M.; Naidek, K. P.; Westphal, E.; Gallardo, H.; Winnischofer, H., Amphiphilic ruthenium bipyridine complex containing long-chain azopyridine group and the mechanism of electron transfer in Langmuir-Blodgett films. *Electrochimica Acta* **2015**, *153*, 574-582.
133. Martínez-Alonso, M., Busto, N., Jalón, F. A., Manzano, B. R., Leal, J. M., Rodríguez, A. M., García, B., Espino, G., Derivation of Structure-Activity Relationships from the Anticancer Properties of Ruthenium(II) Arene Complexes with 2-Aryldiazole Ligands. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 11274-11288.
134. Chen, H.; Parkinson, J. A.; Parsons, S.; Coxall, R. A.; Gould, R. O.; Sadler, P. J., Organometallic Ruthenium(II) Diamine Anticancer Complexes: Arene-Nucleobase Stacking and Stereospecific Hydrogen-Bonding in Guanine Adducts. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 3064-3082.
135. Wang, F., Chen, H., Parsons, S., Oswald, I. D. H., Davidson, J. E., Sadler, P. J., Kinetics of Aquation and Anation of Ruthenium(II) Arene Anticancer Complexes, Acidity and X-ray Structures of Aqua Adducts. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5810 - 5820.

136. Freedman, D. A., Janzen, D. E., Mann, K. R., The Synthesis and Characterization of Potassium 2,2'-Bipyridinetetrakis(ruthenate)
Inorg. Chem. **2001**, 40, 6009-6016.
137. Karlen, T., Hauser, A., Ludi, A., Kinetic Studies on the Photochemically Activated Solvation of $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\eta^6\text{-arene}_2)]^{2+}$ Sandwich Compound. *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 2213-2218.
138. Dumas, P. E., Mercer, E. E., Rates of hydrolysis of the monomeric ruthenium(II) chloride complexes
Inorg. Chem. **1972**, 11, 531-535.
139. Palmucci, J.; Marchetti, F.; Pettinari, R.; Pettinari, C.; Scopelliti, R.; Riedel, T.; Therrien, B.; Galindo, A.; Dyson, P. J., Synthesis, Structure, and Anticancer Activity of Arene-Ruthenium(II) Complexes with Acylpyrazolones Bearing Aliphatic Groups in the Acyl Moiety. *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 11770-11781.
140. Kanzawa, T.; Germano, I. M.; Komata, T.; Ito, H.; Kondo, Y.; Kondo, S., Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death And Differentiation* **2004**, 11, 448.
141. Romero-Canelón, I., Salassa, L., Sadler, P. J., The Contrasting Activity of Iodido versus Chlorido Ruthenium and Osmium Arene Azo- and Imino-pyridine Anticancer Complexes: Control of Cell Selectivity, Cross-Resistance, p53 Dependence, and Apoptosis Pathway. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1291-1300.
142. Garrett, M. D., Cell cycle control and cancer. *Current Science* **2001**, 81.
143. Elsayed, Y. A., Sausville, E. A., Selected Novel Anticancer Treatments Targeting Cell Signaling Proteins. *The Oncologist* **2001**, 6, 517-537.
144. Blagosklonny, M. V.; Pardee, A. B., The Restriction Point of the Cell Cycle. *Cell Cycle* **2002**, 1, 102-109.
145. Romero-Canelón, I., Salassa, L., Sadler, P. J., The Contrasting Activity of Iodido versus Chlorido Ruthenium and Osmium Arene Azo- and Imino-pyridine Anticancer Complexes: Control of Cell Selectivity, Cross-Resistance, p53 Dependence, and Apoptosis Pathway. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1291-1300.
146. Wu, Q.; Fan, C.; Chen, T.; Liu, C.; Mei, W.; Chen, S.; Wang, B.; Chen, Y.; Zheng, W., Microwave-assisted synthesis of arene ruthenium(II) complexes that induce S-phase arrest in cancer cells by DNA damage-mediated p53 phosphorylation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 63, 57-63.
147. Calatuzzolo, C.; Gelati, M.; Ciusani, E.; Sciacca, F. L.; Pollo, B.; Cajola, L.; Marras, C.; Silvani, A.; Vitellaro-Zuccarello, L.; Croci, D.; Boiardi, A.; Salmaggi, A., Expression of Drug Resistance Proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST- π in Human Glioma. *Journal of Neuro-Oncology* **2005**, 74, 113-121.
148. Spiegl-Kreinecker, S.; Buchroithner, J.; Elbling, L.; Steiner, E.; Wurm, G.; Bodenteich, A.; Fischer, J.; Micksche, M.; Berger, W., Expression and Functional Activity of the ABC-transporter Proteins P-glycoprotein and Multidrug-resistance Protein 1 in Human Brain Tumor Cells and Astrocytes. *Journal of Neuro-Oncology* **2002**, 57, 27-36.
149. Tivnan, A.; Zakaria, Z.; O'Leary, C.; Kögel, D.; Pokorny, J. L.; Sarkaria, J. N.; Prehn, J. H. M., Inhibition of multidrug resistance protein 1 (MRP1) improves chemotherapy drug response in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *Frontiers in Neuroscience* **2015**, 9.

150. Bähr, O.; Rieger, J.; Duffner, F.; Meyermann, R.; Weller, M.; Wick, W., P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-associated Protein Mediate Specific Patterns of Multidrug Resistance in Malignant Glioma Cell Lines, but not in Primary Glioma Cells. *Brain Pathology* **2003**, *13*, 482-494.
151. Renschler, M. F., The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. *European Journal of Cancer* **2004**, *40*, 1934-1940.
152. Rocha, C. R. R.; Garcia, C. C. M.; Vieira, D. B.; Quinet, A.; de Andrade-Lima, L. C.; Munford, V.; Belizario, J. E.; Menck, C. F. M., Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* **2014**, *5*, e1505.
153. Montero, D.; Tachibana, C.; Rahr Winther, J.; Appenzeller-Herzog, C., Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox Biology* **2013**, *1*, 508-513.
154. Valdameri, G.; Pereira Rangel, L.; Spatafora, C.; Guitton, J.; Gauthier, C.; Arnaud, O.; Ferreira-Pereira, A.; Falson, P.; Winnischofer, S. M.; Rocha, M. E.; Tringali, C.; Di Pietro, A., Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein. *ACS chemical biology* **2012**, *7*, 322-30.
155. Winter, E.; Lecerf-Schmidt, F.; Gozzi, G.; Peres, B.; Lightbody, M.; Gauthier, C.; Ozvegy-Laczka, C.; Szakacs, G.; Sarkadi, B.; Creczynski-Pasa, T. B.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A., Structure-activity relationships of chromone derivatives toward the mechanism of interaction with and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56*, 9849-60.